

Retino- retinal projizierende
Ganglienzellen
bei der Ratte und beim Kaninchen

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Martin Müller
aus Ottersheim bei Landau/Pfalz
am 7.1.1988



Retino- retinal projizierende
Ganglienzellen
bei der Ratte und beim Kaninchen

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Martin Müller
aus Ottersheim bei Landau/Pfalz
am 7.1.1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Smola

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Zettler

Sondervotum: Prof. Dr. H. Holländer

Tag der mündlichen Prüfung: 31.5.1988

Motto: "Mit der Zeit"

Zusammenfassung

Es gibt Axone retinaler Ganglienzellen, die durch die Sehnervenkreuzung zum anderen Auge ziehen. Diese retino-retinale Projektion wurde in der vorliegenden Arbeit bei Ratte und Kaninchen erstmals genauer untersucht. Mit Hilfe verschiedener Tracer-Substanzen und -Methoden, sowie der Verwendung von retinalen Wholemount-Präparaten wurden Anzahl und Verteilung retino-retinal projizierender Ganglienzellen während der ersten Woche nach der Geburt bestimmt. Das Vorliegen eines Artefaktes infolge der Diffusion von Tracer, z.B. im Chiasma, konnte ausgeschlossen werden.

Bei der Ratte wurden unmittelbar nach der Geburt bis zu etwa 150 solcher Zellen gezählt, beim Kaninchen durchschnittlich nur 2-3. Diese Ganglienzellen sind zwar über die gesamte Retina verteilt, treten im naso-ventralen Quadranten aber gehäuft auf. Während bei der Ratte innerhalb der ersten Woche nach der Geburt eine Reduktion der Anzahl retino-retinaler Ganglienzellen auf einige wenige zu beobachten ist, bleibt sie beim Kaninchen konstant. Einige dieser Ganglienzellen besitzen beim Kaninchen eine Axonkollaterale zum Colliculus superior. Synaptische Kontakte der Ganglienzellaxone in der gegenüber liegenden Retina wurden nicht beobachtet.

Adulte Ratten und Kaninchen besitzen ebenfalls, allerdings nur vereinzelte, retino-retinal projizierende Ganglienzellen. Ihre Verteilung in der Retina entspricht derjenigen bei neugeborenen Tieren.

Die bei Albinismus auftretenden Veränderungen der retinalen Projektion beeinflussen nicht die retino-retinale Projektion. Weder bei neugeborenen noch bei erwachsenen Tieren konnten Unterschiede in der Anzahl und Verteilung retino-retinal projizierender Ganglienzellen festgestellt werden.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung.....	3
Einleitung.....	5
Material und Methoden.....	10
Versuchstiere.....	10
Tracer.....	11
Operationen.....	12
Narkose.....	12
Augeninjektionen.....	13
Doppelinjektionen.....	15
Entfernung einer Retina.....	17
Histologie.....	18
Perfusion.....	18
Wholemound-Präparation der	
Retina.....	20
Verfahren nach HRP-, BHRP-,	
RITC-, RLM-, und FG- Injektion....	21
Autoradiographie.....	23
Versilberungen.....	23
Elektronenmikroskopie.....	25
Ergebnisse.....	27
Augeninjektionen.....	27
Neugeborene Ratten.....	27
Neugeborene Kaninchen.....	31
Adulte Ratten.....	34
Adulte Kaninchen.....	36
Doppelinjektionen.....	38
Neugeborene Ratten.....	38
Neugeborene Kaninchen.....	39
Entfernung einer Retina.....	42
Neugeborene Ratten.....	42
Neugeborene Kaninchen.....	43
Adulte Ratten.....	43
Abbildungen zum Ergebnisteil.....	44
Diskussion.....	51
Die retino-retinale Projektion -	
ein Artefakt?.....	51
Die retino-retinale Projektion	
beim neugeborenen Kaninchen.....	56
RITC als Tracer für die retino-retinale	
Projektion.....	57
Die retino-retinale Projektion	
bei adulten Ratten und Kaninchen.....	58
Sind die retino-retinalen Axone	
Irrläufer?.....	60
Der Abbau transienter Projektionen.....	64
Literatur.....	67
Danksagung.....	85
Lebenslauf.....	86

Einleitung

Während der Ontogenese des Säugetier-Gehirns werden wesentlich mehr Zellen und axonale Verbindungen angelegt als beim erwachsenen Tier später noch vorhanden sind. Zelltod, Abbau von Axonen und terminalen Aufzweigungen sind Bestandteile der normalen Entwicklung (Cowan, 1979; Oppenheim, 1985). Als Folge davon können einige neuronale Verbindungen, die transienten Projektionen, die bei Embryonen und Neugeborenen zu finden sind, bei adulten Tieren nicht mehr nachgewiesen werden. Zur Untersuchung dieser transienten Projektionen bietet sich das visuelle System aufgrund seiner Struktur und des leichten Zugangs durch das Auge ganz besonders an.

Die Axone der Ganglienzellen stellen die einzigen Efferenzen der Säugetier-Retina dar. Sie bilden den Nervus opticus, kreuzen zum überwiegenden Teil im Chiasma auf die contralaterale Seite, um im Tractus opticus weiter zu ziehen. Ein kleiner Teil des Tractus opticus besteht aus Fasern, die im Chiasma nicht auf die gegenüberliegende Seite kreuzen, also vom homolateralen Auge kommen. Viele Axone oder Axonkollateralen der retinalen Ganglienzellen enden im Corpus geniculatum laterale des Thalamus und sind über diesen Kern mit der Großhirnrinde verbunden.

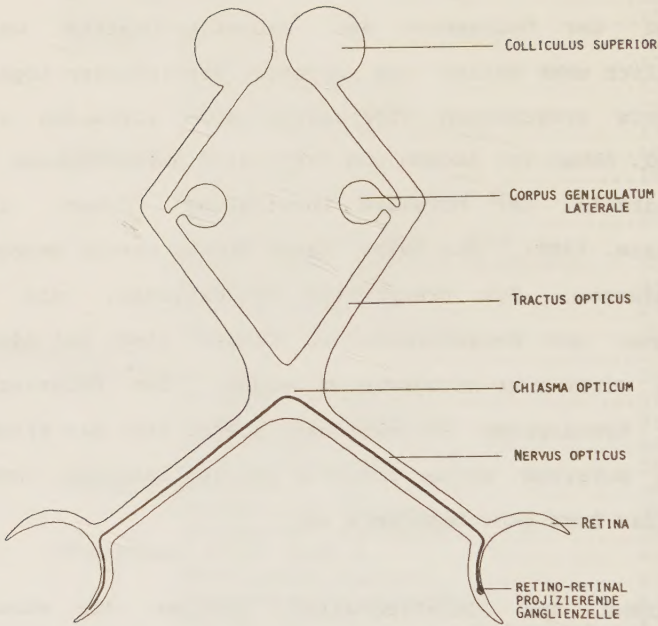


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Teilen des visuellen Systems bei den Säugetieren. Verlauf des Axons einer retino-retinal* projizierenden Ganglienzelle.

Zusätzlich besitzen fast alle Ganglienzellen bei der Ratte (Linden und Perry, 1983) und beim Kaninchen (Vaney et al., 1981) eine Verbindung zum Colliculus superior (Abbildung 1). Daneben gibt es eine Reihe weiterer Efferenzen, die aus einer geringeren Anzahl von Fasern bestehen. Albinotische Tiere haben im Vergleich zu pigmentierten Tieren weniger ungekreuzte und mehr gekreuzte Fasern (zum Überblick: Guillery, 1986).

Bohn und Stelzner (1979) entdeckten zum ersten Male eine retino-retinale Verbindung. Nach Durchtrennung des Nervus opticus beim adulten Frosch fanden sie, daß etwa ein Drittel der neu auswachsenden Axone im Chiasma den "falschen" Weg einschlugen und in den contralateralen Nervus opticus wuchsen. Einige Axone erreichten zwar die andere Retina, doch erwies sich diese retino-retinale Verbindung als transient, sie verschwand wieder innerhalb weniger Wochen nach der Regeneration (Bohn und Stelzner, 1981a,b,c).

Bunt und Lund (1981) fanden eine transiente retino-retinale Verbindung bei einem Säugetier, der Ratte, mit einem maximalen Umfang der Projektion zum Zeitpunkt der Geburt. Im Unterschied zu dem von Bohn und Stelzner (1981a,b,c) beobachteten Phänomen handelt es sich hier um einen Vorgang während der normalen Ontogenese. Albinotische und pigmentierte Tiere unterschieden sich nicht im Umfang und zeitlichen Verlauf des Abbaus der retino-retinalen Projektion.

Bunt et al. (1983) bestätigten diese Befunde. Überdies konnten sie zeigen, daß Ganglienzellen mit retino-retinalen Axonen im Verlauf der ersten Woche nach der Geburt absterben. Ganglienzellen, die sowohl eine Axonkollaterale im anderen Auge, als auch eine zu den Colliculi superiores besitzen, wurden nicht gefunden.

Die vorliegende Arbeit erweitert die Kenntnisse über die retino-retinale Projektion hauptsächlich in drei Punkten. Erstens bezüglich des Umfanges der Projektion bei der Ratte im Verlauf der ersten Woche nach der Geburt. Verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, vor allem Rhodamin-B-isothiocyanat (RITC), sowie Meerrettichperoxidase (HRP) und Choleratoxin-konjugiertes HRP (BHRP) wurden als Tracersubstanzen zur Augeninjektion benutzt und danach Anzahl und Verteilung der retrograd markierten Ganglienzellen in der anderen Retina festgestellt. Die Verwendung retinaler Wholemounts erleichterte die Auswertung. Zusätzlich kamen mit Rhodamin markierte Latexkügelchen zur Verwendung, die aufgrund des großen Durchmessers der Kügelchen beim Transport innerhalb eines Axons als nicht diffusibel gelten können. Ein Tracing mit tritiiertem Leucin (^3H -Leu) und die Anwendung von Degenerationsmethoden sollte die Untersuchung ergänzen.

In Wholemounts wurden nach BHRP-Injektion anterograd markierte Axone aufgesucht und die zu beobachtenden Beadings elektronenmikroskopisch auf das Vorkommen von Synapsen untersucht. Zum zweiten wird eine retino-retinale Verbindung beim neugeborenen Kaninchen, das einer anderen Ordnung angehört, beschrieben und sowohl der Umfang als auch der zeitliche Verlauf ihres Abbaues mit den Ergebnissen bei der Ratte verglichen. Die Frage, ob einige der retino-retinal projizierenden Ganglienzellen eine Axonkollaterale zu einem der Colliculi superiores haben, wurde beim neugeborenen Kaninchen beantwortet. Das Kaninchen eignet sich hierzu besonders, denn es hat ein gut entwickeltes visuelles System und überdies bei der Geburt ein größeres Gehirn und größere Augen als die Ratte.

Einen dritten Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildet die Beschreibung retino-retinal projizierender Ganglienzellen bei erwachsenen Ratten und Kaninchen.

Material und Methoden

Versuchstiere

Für die vorliegende Untersuchung wurden Ratten und Kaninchen verwendet. Die adulten (schwerer als 180g) und die Mehrzahl der neugeborenen Ratten (Tag 1 bis 4 nach der Geburt, wobei Tag 1 mit der Geburt beginnt) stammen aus der SPF-Zucht des Tierhauses der Max-Planck-Institute in Planegg-Martinsried. Es handelt sich dabei um den pigmentierten ACE-Stamm und die albinotischen Wistar-und Sprague-Dawley-Stämme. Die Kaninchen des Chinchilla-Stammes Chbb:CH werden von der Firma Thomae (Biberach) gezüchtet. Die Arbeitsgruppe Neuroanatomie des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie hält eine kleine Kolonie, die durch Nachkauf und eigene Nachzucht ständig ergänzt wird. Von der Firma Savo-Ivanovas (Kisslegg) und der Firma Thomae wurden albinotische Kaninchen des Stammes "Weiße Neuseeländer" erworben. Alle neugeborenen Kaninchen (Tag 1 bis 6 nach der Geburt), sowie ein kleiner Teil der neugeborenen Ratten stammen aus eigener Zucht. Die Anzahl der in den jeweiligen Experimenten verwendeten Tiere ist den Tabellen 1-3 zu entnehmen.

Tracer

1. Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase, HRP), Grad I von Boehringer Mannheim wurde in 30%iger, wässriger Lösung mit 2% DMSO und 0,5% Poly-L-Ornithin verwendet (Hadley und Trachtenberg 1978, Itaya et al. 1978, West und Black 1979).

2. Das Konjugat von HRP mit der Untereinheit B des Choleratoxins (BHRP) von List Biological Laboratories Inc., Campell, California, wurde in 0,1%iger, wässriger Lösung verwendet (Trojanowski et al. 1981, Robertson und Grant 1985).

3. Rhodamin-B-isothiocyanat (RITC) von Sigma (R 1755) wurde in 4%iger wässriger Lösung mit 2% DMSO verwendet (Bonhoeffer und Huf 1980, Thanos und Bonhoeffer 1984, Thanos et al. 1987).

4. Mit Rhodamin markierte Latexkügelchen ("Rhodamine labelled latex microspheres, RLM) von Luma-Fluor Inc., New City, New York, Durchmesser nach Angaben des Herstellers 0,02- 0,2 μm , wurden in der unverdünnten Lösung verwendet (Katz et al. 1984).

5. Nuclear Yellow (NY) von Hoechst wurde in einer 10%igen, wässrigen Lösung verwendet (Bentivoglio et al. 1980a,b).



6. Fluorogold (FG) von Fluorochrome Inc., Englewood, Colorado wurde in 4%iger, wässriger Lösung verwendet (Schmued und Fallon 1986).

7. L- (4,5- ^3H)Leucin (1 mCi/ml) von Amersham Buchler, Braunschweig, wurde unter Stickstoff eingedampft und mit Wasser auf die verwendete Konzentration von 30 $\mu\text{Ci/ml}$ eingestellt (Cowan et al. 1972).

Operationen

Narkose

Für die Dauer von 12 Stunden vor der Narkose erhielten die adulten Tiere kein Futter. Um völlige Schmerzfreiheit zu gewährleisten, wurde ein Gemisch von Rompun 2% (Bayer Leverkusen) und Ketavet 100 mg/ml (Parke-Davis and Company) im Verhältnis 1:1 verwendet. Adulte Kaninchen erhielten intramuskulär 0,5 ml des Gemisches pro kg Körpergewicht, adulte Ratten intramuskulär 2 ml pro kg Körpergewicht. Zur Narkose neugeborener Kaninchen wurde 0,5 ml Gemisch pro kg Körpergewicht, in Verdünnung 1:10 mit Kochsalzlösung, intraperitoneal injiziert. Bei neugeborenen Ratten wurde 1,25 ml Gemisch pro kg Körpergewicht, in Verdünnung 1:50 intraperitoneal injiziert.

Bei Doppelinjektionen in Auge und Colliculus superior von Neugeborenen wurde, um den möglichen Blutverlust gering zu halten, die Narkose durch Herabsetzung der Körpertemperatur verwendet. Die Tiere wurden dazu 8-10 Minuten in Eiswasser gebracht und dann auf Eis operiert. Nach Versorgung der Wunde erwachten sie im Warmwasserbad.

Augeninjektionen

Mit Hilfe eines kleinen Schnittes wurde bei den Neugeborenen zuerst das Augenlid eröffnet. Anschließend erfolgte hier, wie auch bei den adulten Tieren, eine Entlastung des Auges durch Punktion der vorderen Augenkammer. HRP, RITC, Fluorogold oder ^3H -Leu wurden in den Glaskörper injiziert. Um die Verletzung gering zu halten, wurde dazu eine 50 μl Hamilton-Spritze (gastight) mit einer 0,7 mm dünnen Kanüle verwendet. BHRP und mit Rhodamin markierte Latexkügelchen wurden sowohl in den Glaskörper als auch direkt in die Retina injiziert. Bei erwachsenen Tieren wurde die Gesamtmenge in mehreren kleinen Portionen an verschiedenen Stellen des Auges injiziert. Dazu benutzten wir eine Glasmikropipette, die auf die Kapillare eines Drummond Microdispensers geklebt war (Schubert und Holländer, 1975). Die Einstichstellen am Auge lagen an der Cornea-Sklera-Grenze. Alle

Augeninjektionen geschahen von Hand. Bei neugeborenen Ratten wurden 2-3 µl, bei neugeborenen Kaninchen 3-12 µl, bei adulten Ratten 10-30 µl und bei adulten Kaninchen 30-100 µl Flüssigkeit injiziert. Aus dem Auge wieder ausgetretener Tracer wurde sorgfältig entfernt. Anzahl und Alter der Tiere, Tracer, unterschiedliche Überlebenszeiten, sowie die jeweils angewendeten histologischen Verfahren sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Augeninjektionen mit HRP, BHRP, RITC, RLM und FG. R=Ratte, K=Kaninchen, a=albino, p=pigmentiert, Alter=Alter bei Perfusion, ÜZ=Überlebenszeit nach Injektion. Unter "Histologie" sind die untersuchten Strukturen, sowie die HRP-Nachweisreaktionen angegeben. TMB=Tetramethylbenzidin, EM=Elektronenmikroskopie.

n	Spezies	a/p	Alter	Tracer	Üz	Histologie
9	R	a	2d	HRP	1d	TMB Retina
2	R	a	2d	BHRP	1d	TMB Retina
5	R	a	2d	BHRP	1d	TMB Chiasma
5	R	a	2d	BHRP	1d	TMB Retina für EM
5	R	p	2d	RITC	1d	Retina und Chiasma
1	R	a	2d	RLM	1d	Retina
3	R	a	2d	RLM	1d	Retina
2	R	a	2d	FG	1d	Retina
5	R	a	3d	³ H-Leu	1d	Retina und Chiasma
5	R	a	adult	RITC	1d	Retina, teilw. Chiasma
6	R	p	adult	RITC	1d	dito
1	R	a	adult	RITC/HRP	1d	TMB Retina

Fortsetzung der Tabelle 1 auf der nächsten Seite.

Fortsetzung von Tabelle 1.

n	Spezies	a/p	Alter	Tracer	Üz	Histologie
17	K	p	2d	HRP	1d	TMB Retina, 5x Chiasma
12	K	p	2d	RITC	1d	Retina
8	K	p	3d	HRP	1d	TMB Retina, 6x Chiasma
5	K	a	3d	RITC	1d	Retina
2	K	p	4d	HRP	1d	TMB Retina
6	K	p	4d	RITC	1d	Retina, 5x Chiasma
5	K	a	6d	RITC	1d	Retina
3	K	p	7d	RITC	1d	Retina und Chiasma
1	K	p	adult	HRP	1d	PPDPC Retina, TMB Chiasma
1	K	p	adult	HRP	2d	TMB Retina
3	K	a	adult	RITC	1d	Retina
4	K	p	adult	RITC	1d	Retina
1	K	a	adult	RITC	2d	Retina
1	K	p	adult	RITC	2d	Retina und Chiasma

Doppelinjektionen bei Neugeborenen

Das Os interparietale wurde durch einen medialen Schnitt in die Kopfhaut freigelegt, an den noch nicht verwachsenen Nähten von den umgebenden Knochen abgetrennt und vorsichtig zur Seite geklappt. Nach Eröffnung der Dura mater wurde Nuclear Yellow in einen der Colliculi superiores injiziert. Um eine erschütterungsfreie Injektion zu gewährleisten, wurde eine 5 µl Hamilton Spritze an einem Mikromanipulator befestigt. Eine Infusionspumpe, die über ein ölgefülltes

Schlauchsystem den Kolben der Spritze vorschob, erlaubte eine gleichmäßig langsame Injektion über 5 Minuten (Schubert und Holländer 1975). Es wurden bei neugeborenen Ratten 0,3-1 μ l, bei neugeborenen Kaninchen 1-5 μ l injiziert. Nach Zurückklappen des Os parietale wurde die Wunde mit einer Naht und Sprühverband verschlossen. Anschließend erfolgte die Augeninjektion mit RITC, sowohl homolateral als auch contralateral zur Seite des injizierten Colliculus superior. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Anzahl und das Alter der verwendeten Tiere und den Injektionsort.

Tabelle 2: Doppelinjektionen. Abkürzungen siehe Tabelle 1. "Homolateral" und "contralateral": Seite des injizierten Colliculus superior im Verhältnis zum injizierten Auge.

n	Spezies	a/p	Alter	Coll. s.
1	R	p	3d	homol.
1	R	p	3d	contral.
1	R	p	5d	homol.
1	K	a	3d	homol.
5	K	a	3d	contral.

Entfernung einer Retina

Neugeborene Ratten (Wistar) und Kaninchen (Weiße Neuseeländer) sowie adulte Ratten (Wistar) wurden einseitig enucleiert. In tiefer Narkose, bei den Neugeborenen nach Durchtrennung des noch verwachsenen Augenlids, wurde in die Cornea seitlich halbmondförmig eingeschnitten. Durch diese Öffnung konnte zuerst die Linse entfernt werden, dann durch Absaugen mit einer kleinen, sorgfältig abgerundeten Glaskanüle auch der Glaskörper und die Retina mit Chorioidea. Der entstandene Hohlraum wurde mit einem Stückchen resorbierbaren Gelatineschwamms (B. Braun Melsungen AG) gefüllt und die Cornea mit resorbierbarem Garn genäht. Zur Verhütung von Infektionen wurde das Auge mit einer antibiotischen Salbe (Neotracin^R, Dispersa Baeschlin GmbH, Germering) behandelt, zusätzlich bekamen die Tiere intraperitoneale bzw. intramuskuläre Injektionen eines Breitbandantibiotikums (Totocillin^R, Bayer Leverkusen). Zur Schmerzstillung wurde Novalgin^R (Hoechst) subcutan gegeben. Die neugeborenen Ratten wurden nach einem Tag, die neugeborenen Kaninchen nach 3 Tagen und die adulten Ratten nach 4, 6 oder 10 Tagen getötet. 3 adulte, nicht enucleierte, Ratten dienten der Kontrolle. Die Anzahl der Tiere je Experiment, sowie das jeweilige histologische Verfahren sind in der Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Degenerationsexperimente. Abkürzungen siehe Tabelle 1. Gew=Gewicht. Unter Retina bzw. Chiasma ist die Untersuchungsmethode angegeben.

n	Spezies	Alter/ Gew	Retina	Chiasma
1	R	2 Tage	Nauta 1957	Nauta 1957
1	R	2 Tage	Nauta 1957	-
1	R	2 Tage	Glees 1946	-
1	R	2 Tage	Schneider 1969	Schneider 1969
1	R	2 Tage	Heimer 1970	-
3	K	1 Tag	Rager 1979	-
3	R	180-210g	-	Nauta 1957
3	R	250g	-	Nauta 1957

Histologie

Perfusion

Alle Tiere wurden durch Injektion einer überdosiert Pentobarbital (Narcoren^R, IFFA Merieux GmbH, Laupheim) getötet. Um die Blutgerinnung zu verhindern, wurde Heparin (Novo Industrie GmbH, Mainz) verwendet. Adulte Kaninchen wurden dazu wie bei der Operation narkotisiert und erhielten das Heparin durch Injektion in die Ohrvene. Neugeborene Ratten und Kaninchen wurden durch intraperitoneale Injektion getötet und durch intracardiale Injektion heparinisiert. Adulte Ratten wurden vor

Verabreichung der intraperitonealen bzw. intracardialen Injektionen mit Äther betäubt. Unmittelbar nach Eintritt des Atemstillstands wurde bei allen Tieren der Thorax eröffnet, das Herz vom Pericard befreit und eine Glas-oder Metallkanüle in die linke Kammer eingeführt. Gleichzeitig mit der Eröffnung des rechten Herzhohls erfolgte die Zufuhr von Flüssigkeit durch die Kanüle. Zum Ausspülen des Blutes wurde 0,1M Phosphatpuffer in 0,9% Kochsalzlösung, pH 7,3-7,4 verwendet. Anschließend wurde das zu untersuchende Auge entnommen, da die Retina nach Fixierung an der Chorioidea anhaften und in Form eines Bechers härten würde. Bei den Ratten wurde noch vor Entnahme des Auges auf der Cornea dorsal mit wasserunlöslichem Filzstift eine Markierung angebracht. Bei Kaninchen kann die Orientierung der Retina nach der Präparation anhand des visual streak erfolgen.

In denjenigen Fällen, in denen das Chiasma oder andere Hirnteile untersucht werden sollten, wurde die Perfusion fortgesetzt. Bei Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen kann Glutaraldehyd, infolge der entstehenden Eigenfluoreszenz, nicht als Fixans dienen. Deshalb wurde hier ausschließlich 4% Formaldehyd aus Paraformaldehyd in 0,1M Phosphatpuffer in 0,9% Kochsalzlösung, pH 7,3-7,4 verwendet. Die Dauer der Perfusion betrug bei den Neugeborenen ca. 10 Minuten, bei den adulten Tieren ca. 30 Minuten. Die Gehirne wurden sofort präpariert und im Falle der Neugeborenen mehrere Stunden nachfixiert. Bis zur

Weiterverarbeitung wurden die Gehirne im Puffer aufbewahrt (nicht länger als 24 Stunden). Bei Experimenten mit HRP oder BHRP erfolgte die weitere Perfusion mit 3% Glutaraldehyd in demselben Puffer oder in einem 0,1M Natrium-Cacodylatpuffer, pH 7,4. Auch hier wurden die Gehirne der Neugeborenen mehrere Stunden nachfixiert und wie die Gehirne der adulten Tiere im entsprechenden Puffer aufbewahrt. Die enucleierten Tiere und die Kontrolltiere wurden mit Formol (wie oben) perfundiert, die Gehirne allerdings während der 2 Wochen dauernden Nachfixierung im Schädel belassen. Nur das Schädeldach wurde eröffnet.

Nach mehreren Experimenten erwies sich bei Neugeborenen eine Perfusion nach Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen dann als überflüssig, wenn nur die Retina untersucht werden sollte. In diesen Fällen wurden die Tiere dekapitiert.

Wholemout- Präparation der Retina

Die gesamte Präparation der Retina erfolgte in 0,1M Phosphatpuffer in 0,9% Kochsalzlösung unmittelbar in Anschluß an die Entnahme des Auges. Dem Augapfel noch anhängende Muskel- und Bindegewebsanteile wurden entfernt. Mit Hilfe einer Rasierklinge wurde dann in Höhe der Ora serrata ein kleiner, äquatorialer Schnitt gesetzt und von dort aus durch Fortsetzung des Schnittes mit einer Schere der vordere Teil des Augapfels abgetrennt. Bei den Ratten wurde an der Stelle der Cornea-Markierung in Retina und

Chorioidea eingeschnitten, sodaß das Retinapräparat später dorsal einen tiefen Einschnitt besaß. Nach Entfernen von Linse und Glaskörper konnte mit einem Spatel die unfixierte Retina vorsichtig abgelöst und nach Durchschneiden des Nervendurchtrittes völlig isoliert werden. Das Präparat wurde nun auf einem Objektträger, mit der Ganglienzellschicht nach oben, an den Rändern eingeschnitten und ausgebreitet. Um eine Härtung der Retinae in dieser Form zu erreichen wurden sie, von der Oberflächenspannung gehalten, schwimmend fixiert (Stone 1981). Dabei wurden die bei der Perfusion angegebenen Aldehydlösungen verwendet. Die Dauer der Fixierung betrug eine Stunde. Anschließend wurden die Retinae mehrmals in Puffer gewaschen.

Das Verfahren nach HRP-, BHRP-, RITC-,
RLM-oder FG-Injektion

Zur Untersuchung des Chiasmas wurden Horizontalschnitte mit dem Gefriermikrotom angefertigt. Sie waren bei Neugeborenen 20 µm und bei den adulten Tieren 30 µm dick. Die Schnitte wurden in Puffer aufgefangen und schnellstmöglich weiterverarbeitet.

HRP und BHRP wurden mit zwei verschiedenen Reaktionen nachgewiesen, zum einen nach Hanker et al. (1977) mit para-Phenylendiamin und Brenzcatechin und zum anderen nach Mesulam (1978) mit Tetramethylbenzidin (TMB). Die erste

Methode erlaubt eine durchgehende Darstellung HRP-enhaltender Strukturen, benötigt aber größere Mengen transportierten Enzyms als die zweite. Die Reaktion nach Mesulam erzeugt dagegen einzelne Kristalle, die nicht immer bestimmten Strukturen zuzuordnen sind; ein Problem gerade bei einzelnen markierten Axonen im Chiasma. Retinae und Gefrierschnitte wurden frei flottierend reagiert. Direkt im Anschluß an die Reaktionen wurden die Retinae mit 2%, die Schnitte mit 0,9% Gelatine auf Objektträger aufgezogen und über Nacht an der Luft getrocknet. Obwohl diese Methode bei den relativ dicken Retinae zu Artefakten führt, wird so der Kontakt mit Äthanol vermieden, der einen Teil der TMB-Granula wieder auflösen würde. Die Schnitte wurden dagegen zusätzlich zweimal 10s in 100% Äthanol entwässert. Nach zweimaligem Spülen in Xylol wurde mit DePeX (BDH Chemicals Ltd., Pool, England) eingedeckt.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden Retinae und Schnitte ohne weitere Vorbehandlung mit 2% bzw 0,9% nicht fluoreszierender Gelatine (Merck Art. 4070) aufgeklebt, luftgetrocknet, zweimal in Xylol gespült und mit Fluoromount mountant (BDH Chemicals Ltd., Pool, England) eingedeckt. Für die Untersuchung wurde ein Leitz Orthoplan-Mikroskop mit Ploemopak-Filterblöcken benutzt (Block N2 für RITC und RLM, Block A für NY und FG).

Autoradiographie

Die mit ^3H -Leu injizierten neugeborenen Ratten und Kaninchen wurden nach 24 Stunden dekapitiert, die Augen entnommen und die retinalen Wholemounts und Gehirne für 2 Tage in Carnoy's Fixativ (Äthanol/ Chloroform/ Eisessig wie 6:3:1) fixiert. Retina und Chiasma wurden dann langsam in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und über Methylsalicylat und Xylol in Paraffin (Paraplast, Lancer, Oxford) eingebettet. Von allen Präparaten wurde eine nahezu lückenlose 7 μm -Schnittserie angefertigt. Das Chiasma wurde horizontal, die Retina flach, von der Ganglienzellschicht zur Schicht der Photorezeptoren hin, geschnitten. Die Schnitte wurden mit Chromalaungelatine aufgezogen, luftgetrocknet, mit Xylol entparaffiniert, in absteigender Alkoholreihe und Aqua dest. wieder rehydriert. Als Fotoemulsion zur Beschichtung der Objektträger wurde Kodak NTB 2- Nuclear Track Emulsion (in einer 1:1-Verdünnung mit Wasser) verwendet. Die Expositionszeit bei 4°C betrug 4 Wochen. Nach Entwicklung, Fixierung, Gegenfärbung mit Kresylviolett, Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol wurde mit DePeX eingedeckt (Hendrickson und Edwards 1978).

Selektive Versilberungen degenerierender Strukturen

Nach Abtrennung eines Axons vom Zellkörper kommt es zu einer anterograden Degeneration. Solche degenerierenden Axonabschnitte zeigen eine gegenüber normalen Axonen verstärkte Argyrophilie. Dieser Umstand wird bei der

selektiven Versilberung degenerierender Axone nach Nauta-Laidlaw (Nauta 1957) benutzt. Diese Methode wurde hier mit Erfolg für die Gefrierschnitte durch das Chiasma adulter Ratten nach Enucleation verwendet. Die Schnitte werden dazu frei flottierend imprägniert, in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, in Karbolxylol gespült, auf die Objektträger aufgezogen und in Dammarharz eingedeckt. Gewebe von Neugeborenen ließ sich aber nicht in ausreichendem Maße versilbern. Schneider (1969) beschreibt dieses Phänomen und schlägt ein abweichendes Verfahren vor, das hier bei neugeborenen Ratten, aber gleichfalls ohne Erfolg angewendet wurde. Zur Anwendung einer dritten Methode (Heimer 1970) wurde eine flach fixierte Retina in Kunstharz (Epon) eingebettet und von der Region um den Abgang des Nervus opticus 3 µm dicke Horizontalschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden nach der Reaktion aufgezogen und in Immersionsöl eingedeckt. Auch dieses Verfahren führte nicht zum Erfolg. Alle Methoden wurden an einigen Schnitten durch das Corpus geniculatum laterale und den Colliculus superior erprobt.

Unspezifische Versilberungen

Bei Neugeborenen wurden zwei weitere Methoden zur Versilberung verwendet, die normale Neurone und Axone ebenso imprägnieren wie degenerierende Strukturen. Eine Stückimprägnation der Retina einer neugeborenen Ratte nach Glees (1946) gelang. Die davon anzufertigenden Paraffinschnitte erwiesen sich aber nicht von ausreichender

Qualität um degenerierende Axone zu erkennen. Deshalb wurde bei 3 neugeborenen, enucleierten Kaninchen eine zweite Methode (Rager et al. 1979) angewendet, bei der zuerst horizontale, 7 μ m dicke Schnitte von der flach fixierten und in Paraffin eingebetteten Retina bzw. des Chiasmas angefertigt wurden. Die aufgezogenen Schnitte wurden entparaffiniert, rehydriert, mit Kaliumchromat vorbehandelt, um die Argyrophilie des Gewebes etwas herabzusetzen, und dann in einer Lösung von AgNO_3 in Borsäure-Boraxpuffer pH 8,0 inkubiert. An den entsprechenden Strukturen angereichertes Silber wurde mit Hilfe einer Entwicklerlösung aus NaCO_3 , Wolframato-kieselsäure, NH_3NO_3 und Formol niedergeschlagen und anschließend fixiert. Die Schnitte wurden nach dem Entwässern in Canadabalsam eingedeckt. Erwartet wurde eine stärkere Imprägnation degenerierender Strukturen, da diese mehr argyrophil sind als normale Strukturen. Auch hier wurden die Methoden an Schnitten durch das Corpus geniculatum laterale und den Colliculus superior erprobt.

Elektronenmikroskopie

5 neugeborene, albinotische Ratten wurden mit BHRP in die Retina eines Auges injiziert. 24 Stunden danach wurden die Tiere narkotisiert und mit 3% Glutaraldehyd in 0,1M Natriumcacodylat- Puffer pH 7,4 mit 0,02% $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ perfundiert. Die so in Becherform fixierte Retina wurde vorsichtig von Chorioidea, Sklera und Glaskörper befreit, nach Mesulam (1978) mit TMB reagiert und anschließend durch

viele Radiärschnitte in kleine Stückchen zerteilt, die lichtmikroskopisch betrachtet wurden. 3 Axone, die nicht mit einer Ganglienzelle in Verbindung standen, wurden ausgewählt und Abschnitte, die Beadings enthielten, herausgeschnitten. Diese Gewebestücke, mit Kantenlängen von maximal einem Millimeter, wurden mit 1% gepuffertem OsO_4 für eine Stunde nachfixiert, in aufsteigender Alkoholreihe entwässert (10 Minuten für jede Stufe) und über Propylenoxid in Epon eingebettet. Das gesamte Gewebestück wurde dann in $4\mu\text{m}$ dicke Semidünnschnitte zerlegt und zwar quer zur Retina und längs zum markierten Axon. Diejenigen Semidünnschnitte, die lichtmikroskopisch sichtbare TMB-Kristalle aufwiesen, wurden auf einen Leerblock aus Epon aufgeklebt und in Ultradünnschnitte zerlegt (Holländer 1970). Die Kontrastierung erfolgte mit Uranylacetat (20 Minuten bei 20°C) und Bleinitrat (18 Minuten bei 20°C). Die Schnitte wurden mit einem Zeiss EM 10 untersucht.

Ergebnisse

Augeninjektionen

Neugeborene Ratten

HRP/TMB

In einem Vorversuch wurde Albinoratten am Tag der Geburt HRP in den Glaskörper des Auges injiziert und die contralaterale Retina mit TMB reagiert. Infolge mangelhafter Perfusion enthielten die Präparate große Mengen an Erythrocyten, die aufgrund ihres Gehaltes an endogener Peroxidase mit dieser Methode ebenfalls dargestellt werden. Das Auffinden und Identifizieren von retrograd mit HRP gefüllten, hier noch nicht voll differenzierten und kleinen Ganglienzellen war deshalb sehr schwierig. So konnte nur eine qualitative Auswertung stattfinden. Alle untersuchten Retinae enthielten eine größere Anzahl markierter Ganglienzellen, sicher identifiziert werden konnten jeweils etwa 30 Zellen. Axone in der Retina waren nicht markiert.

BHRP

In einem ersten Experiment wurden 2 Albinoratten am Tag der Geburt BHRP in den Glaskörper injiziert, um eine, im Vergleich mit HRP, bessere anterograde Markierung der Axone zu erreichen. Es fanden sich in den contralateralen Retinae

nur eine bzw. 9 markierte Ganglienzellen, dagegen 2 markierte Axone mit Beadings. In einem zweiten Experiment wurde bei 5 Albinoratten am Tag der Geburt das BHRP direkt in die Retina injiziert. Die Untersuchung beschränkte sich auf Schnitte durch das Chiasma. In allen Präparaten waren mehrere markierte Axone je Schnitt im contralateralen Nervus opticus darstellbar (Abbildung 2).

RITC

Bei 6 Tieren wurde am 2. Tag nach der Geburt RITC in den Glaskörper injiziert. Eine Ratte war albinotisch, 5 pigmentiert. Bei der Untersuchung am 3. Tag wurden die retrograd markierten Ganglienzellen (Abbildungen 3 und 4) in der contralateralen Retina gezählt und ihre Lage in einem der 4 Quadranten festgehalten. Es wurden 4 (Albinoratte), 45, 62, 75, 80, und 121 Zellen gezählt. Unabhängig von der jeweils entdeckten Anzahl, waren die Zellen auf typische Art ungleichmäßig über die Retina verteilt. 68,6% dieser Zellen lagen in der ventralen Hälfte, im naso-ventralen Quadrant allein 42,9% (Abbildung 23A). Außerdem fanden sich in der Retina markierte Axone, die vom Abgang des Nervus opticus bis in die Peripherie verfolgt werden konnten, ohne daß eine zugehörnde Zelle zu finden war (Abbildung 5). Die Schnitte durch das Chiasma zeigten einige markierte Fasern im contralateralen Nervus opticus.

FG

2 Albinoratten wurde am Tag der Geburt Fluorogold in den Glaskörper injiziert. In den contralateralen Retinae fanden sich 101 bzw. 146 retrograd markierte Ganglienzellen. Die Verteilung glich derjenigen nach RITC-Injektion: 87% aller Zellen lagen im ventralen Bereich der Retinae, 63,2% allein im naso-ventralen Quadranten. Axonale Markierung war nicht zu finden.

RLM

In einem ersten Experiment wurden die mit Rhodamin markierten Latexkügelchen in den Glaskörper einer Albinoratte am Tag der Geburt injiziert. Nur 5 retrograd markierte Ganglienzellen ließen sich daraufhin in der contralateralen Retina finden. In einem zweiten Experiment wurden die Kügelchen bei 3 Albinoratten am Tag der Geburt direkt in die Retina injiziert. In den contralateralen Retinae fanden sich 18, 54 und 134 markierte Ganglienzellen (Abbildungen 6 und 7). Die Verteilung glich derjenigen bei RITC-Injektion: 73,3% aller Zellen lagen im ventralen Bereich der Retinae, 46,6% allein im naso-ventralen Quadranten. Axonale Markierung konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Tabelle 4 faßt die Ergebnisse nach Injektion der Fluoreszenztracer bei der neugeborenen Ratte vergleichend zusammen.

Tabelle 4: Vergleich fluoreszierender Tracer bei der neugeborenen Ratte. n=Anzahl der untersuchten Retinae, GZ=Gesamtzahl aller markierten Ganglienzellen, $\bar{x}$ =mittlere Anzahl markierter Zellen je Retina, ventral/naso-v.=prozentualer Anteil der in dem betreffenden Retinaabschnitt liegenden Anzahl markierter Zellen.

Tracer	n	GZ	$\bar{x}$	ventral	naso-v.
RITC	6	387	64,5	68,6	42,9
FG	2	247	123,5	87,0	63,2
RLM	3	206	68,7	73,3	46,6

³H-Leu

Bei 5 Albinoratten wurde am Tag der Geburt ³H-Leu in den Glaskörper injiziert. In den Autoradiogrammen von Schnitten der contralateralen Retina und des Chiasmas war eine ungewöhnlich große Anzahl offensichtlich unspezifischer Silberkörner über dem Gewebe zu sehen. Der Nervus opticus auf der Seite der Injektion war in allen 5 Fällen sehr stark markiert. Die Autoradiogramme zeigten, daß einzelne markierte Axone nicht dargestellt werden können, da hier nur lockere Reihen von Silberkörnern in einer Schicht über dem Gewebe liegen. Diese Reihen lassen sich in aller Regel keinen bestimmten Axonen zuordnen, da diese bei Neugeborenen sehr dünn sind. Nur in 2 Retinae war jeweils eine Stelle zu finden, wo über der Schicht der Ganglienzellaxone ungewöhnlich große Anhäufungen von

Silberkörnchen möglicherweise eine spezifische Aktivität anzeigten. In einer der Retinae fand sich diese Aktivität in zwei aufeinander folgenden Schnitten an gleicher Stelle (Abbildung 8).

Elektronenmikroskopische Untersuchung anterograd markierter Axone bei der neugeborenen Ratte

Die nach der Reaktion mit TMB erkennbaren Beadings anterograd markierter Axone wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Bestimmte, lichtmikroskopisch in den Semidünnschnitten identifizierte Ansammlungen von TMB-Kristallen, konnten mit Hilfe des Elektronenmikroskops in den Ultradünnschnitten wiedergefunden werden. Sie lagen sämtlich in der Schicht der Ganglienzellaxone. Hinweise auf synaptische Kontakte wurden nicht gefunden.

Neugeborene Kaninchen

In der ersten Serie von Experimenten wurde 29 pigmentierten Kaninchen am Tag der Geburt HRP (in 17 Fällen) oder RITC in den Glaskörper injiziert. In den contralateralen Retinae fanden sich am folgenden Tag nach HRP-Injektion 6x0, 2x1, 4x2, 3x3 und 2x10, zusammen 39 retrograd markierte Ganglienzellen. Es wurden also im Mittel 2,3 Zellen pro Retina gefunden. In 5 Fällen wurden Schnitte durch das Chiasma angefertigt, jedoch konnten markierte Axone im contralateralen Nervus opticus nicht zweifelsfrei

identifiziert werden. Nach RITC-Injektion wurden 5x0, 1x1, 3x2, 1x3 und 2x4, insgesamt 18 retrograd markierte Ganglienzellen gefunden (Abbildung 9). Das sind im Mittel 1,5 Zellen pro Retina.

19 weitere Tiere wurden am 2. Tag nach der Geburt injiziert, 8 pigmentierte Kaninchen mit HRP und 11 albinotische Kaninchen mit RITC. Bei letzteren sind auch die Fälle mit einer zusätzlichen Injektion in den Colliculus superior enthalten. In den Retinae contralateral zum injizierten Auge fanden sich nach HRP-Injektion 1x0, 3x1, 3x3 und 1x5, zusammen 17 retrograd markierte Ganglienzellen (Abbildung 10). In 6 Fällen wurden Schnitte durch das Chiasma untersucht, markierte Axone wurden nicht gefunden. Nach RITC-Injektion waren es 6x0, 2x2, 1x4, 1x7 und 1x16, zusammen 31 Zellen (Abbildung 11). Im Mittel wurden 2,13 Zellen nach HRP- und 2,8 Zellen nach RITC-Injektion gefunden. In einigen der untersuchten Retinae fanden sich markierte Axone, die nicht mit einer der Ganglienzellen im Präparat in Verbindung standen (Abbildung 12).

8 Kaninchen wurden am 3. Tag nach der Geburt injiziert, 2 pigmentierte Tiere mit HRP und 6 albinotische mit RITC. 2 der contralateralen Retinae in denen RITC-Markierung erwartet wurde, kamen mit Glutaraldehyd in Berührung und waren infolge der entstehenden starken Hintergrundfluoreszenz nicht mehr auswertbar. In den

restlichen Präparaten waren weder nach HRP-noch nach RITC-Injektion retrograd markierte Ganglienzellen zu finden. In den Gefrierschnitten durch das Chiasma von 5 der RITC-injizierten Kaninchen konnten dagegen einige markierte Axone im contralateralen Nervus opticus entdeckt werden (Abbildung 13).

5 albinotischen Kaninchen wurde am 5. Tag nach der Geburt RITC in den Glaskörper injiziert. Die contralateralen Retinae wiesen einen Tag später 2x0 und 3x1, zusammen 3 retrograd markierte Ganglienzelle auf. Das sind im Mittel 0,6 Ganglienzellen pro Retina.

3 weitere pigmentierte Kaninchen wurden am 6. Tag nach der Geburt mit RITC injiziert. Hier fanden sich 2x1 und 1x4, somit 6 Zellen. Das sind im Mittel 2,0 Ganglienzellen pro Retina. In den von allen 3 Fällen angefertigten Chiasmaschnitten waren markierte Axone im contralateralen Nervus opticus zu entdecken. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Anzahl der gefundenen, retrograd markierten Ganglienzellen bei Kaninchen, im Verlauf der ersten Woche nach der Geburt.

Die Verteilung der markierten Zellen über die Retina, für alle untersuchten Tiere zusammengefaßt, ist wie bei den neugeborenen Ratten ungleichmäßig. Nur 17% lagen in der dorsalen Retina, 53% lagen allein im naso-ventralen Quadranten. Ein Beispiel zeigt Abbildung 23C. Im

Unterschied zu Ratten haben Kaninchen allerdings eine Retina, deren ventraler Teil weitaus größer ist als der dorsale, sodaß in dieser Hinsicht die Spezies nicht vergleichbar sind.

Tabelle 5: Anzahl retrograd markierter Ganglienzellen nach HRP- und RITC-Injektion bei neugeborenen Kaninchen in der ersten Woche nach der Geburt. Alter = Alter in Tagen bei Perfusion, n = Anzahl der untersuchten Retinae, Zellen = Gesamtzahl retrograd markierter Ganglienzellen pro Tag, $\bar{x}$ = mittlere Anzahl markierter Ganglienzellen pro Retina. Am Tag 6 wurden 2 Retinae nicht gewertet (vgl. Tab 1). Bei Tag 3 sind die Fälle mit Doppelinjektion enthalten.

Alter	2	3	4	6	7
n	29	19	6	5	3
Zellen	57	48	0	3	6
$\bar{x}$	2,0	2,5	0	0,6	2,0

Adulte Ratten

12 adulte Ratten bekamen RITC-Injektionen in den Glaskörper. 6 der Tiere waren pigmentiert und 6 albinotisch. Eine dieser albinotischen Ratten bekam zusätzlich ins andere Auge eine HRP-Injektion. Das RITC-injizierte Auge wies einen Tag später eine HRP-gefüllte Ganglienzelle auf, wogegen im HRP-injizierten

Auge keine RITC-Markierung zu sehen war. Bei 3 weiteren Albinoratten wurden 2x2 und 1x7 retrograd markierte Ganglienzellen in der contralateralen Retina gefunden (Abbildung 16), außerdem noch markierte Axone, die nicht mit einer der markierten Ganglienzellen in Verbindung standen. Das sind zusammen 12 und im Mittel 2 markierte Ganglienzellen pro Retina. In 2 Fällen wurden Gefrierschnitte des Chiasmas untersucht und bei einem Tier markierte Axone im contralateralen Nervus opticus gefunden. In der Retina von nur einer der 6 pigmentierten Ratten wurde eine retrograd markierte Ganglienzelle gefunden. Eine weitere Retina zeigte ein markiertes Axon mit Beadings, das nicht mit einer markierten Ganglienzelle in Verbindung stand (Abbildung 17). In 2 Fällen wurden Schnitte durch das Chiasma untersucht, aber keine markierten Axone im contralateralen Nervus opticus gefunden. Die Verteilung der Zellen über die Retina ähnelt derjenigen bei neugeborenen Ratten. 3 von insgesamt 12 Zellen lagen im dorsalen Bereich, allein 6 lagen im naso-ventralen Quadranten (Abbildung 23B). Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Adulte Kaninchen

2 adulten, pigmentierten Kaninchen wurde HRP in den Glaskörper des Auges injiziert. Eine contralaterale Retina wurde mit TMB, die andere mit p-Phenylendiamin/Brenzcatechin reagiert. Im ersten Fall wurden 2, im zweiten Fall eine retrograd markierte Ganglienzelle gefunden (Abbildung 20). In der mit TMB reagierten Retina fand sich ein markiertes Axon (Abbildung 19). 5 weitere adulte, pigmentierte Kaninchen erhielten RITC-Injektionen in den Glaskörper. Hier enthielten 2 contralaterale Retinae keine retrograd markierten Ganglienzellen, 2 weitere enthielten je eine und eine Retina 2 Zellen (Abbildung 21). In einem Fall wurde das Chiasma untersucht und ein markiertes Axon im contralateralen Nervus opticus gefunden (Abbildung 22).

4 weiteren adulten, aber albinotischen Kaninchen wurde RITC in den Glaskörper injiziert. In der contralateralen Retina eines Tieres wurde eine retrograd markierte Ganglienzelle gefunden. Die Anzahl aller, bei den adulten Kaninchen gefundenen, retrograd markierten Ganglienzellen ist in Tabelle 6 zusammengefaßt. Sämtliche markierten Zellen lagen im naso-ventralen Quadranten (Abbildung 23D).

Eines der albinotischen und zwei der pigmentierten Tiere wurden nicht bereits nach 24, sondern erst nach 48-55 Stunden getötet. Bei einem Tier wurden keine, bei zweien je eine retrograd markierte Ganglienzelle gefunden. Die Zellzahlen bei verschiedenen Überlebenszeiten sind in Tabelle 7 noch einmal zusammengestellt.

Tabelle 6: Retrograd markierte Ganglienzellen nach HRP-oder RITC-Injektion bei adulten Ratten und Kaninchen. R=Ratte, K=Kaninchen, p=pigmentiert, a=albinotisch, m=Anzahl der Retinae mit markierten Ganglienzellen, Z=Anzahl retrograd markierter Ganglienzellen.

Spezies	a/p	n	m	Z
R	p	6	1	1
	a	6	4	12
K	p	7	5	7
	a	4	1	1

Tabelle 7. Vergleich der Anzahl retrograd markierter Ganglienzellen nach unterschiedlichen Überlebenszeiten bei adulten Kaninchen. a=albinotisch, p= pigmentiert, ÜZ=Überlebenszeit. Unter RITC bzw HRP stehen die in jeder Retina gefundenen markierten Ganglienzellen nach Anwendung der entsprechenden Nachweismethode.

	ÜZ	RITC	HRP
a	24 Std	1,0,0	-
	48 Std	0	-
p	24 Std	2,1,0,0	2
	48 Std	1	1

Doppelinjektionen

Neugeborene Ratten

Injektion in den Colliculus superior contralateral zum untersuchten Auge:

Eine pigmentierte Ratte wurde am 2. Tag nach der Geburt mit RITC ins linke Auge und mit NY in den linken Colliculus superior injiziert. Bei Untersuchung der Injektionsstelle war nur geringe Anfärbung des Colliculus superior, dafür aber eine massive Injektion des Colliculus inferior zu sehen. Demzufolge fand sich auch in der untersuchten rechten Retina kaum eine Markierung durch NY. Obwohl die RITC-Markierung den erwarteten Umfang von 60 Ganglienzellen hatte, waren keine doppelt markierte Zellen zu sehen.

Eine zweite pigmentierte Ratte wurde am 4. Tag nach der Geburt mit NY in den linken Colliculus superior injiziert. Die RITC-Injektion erfolgte in das linke Auge. Große Teile der Ganglienzellen im nasalen Bereich der rechten Retina wiesen Zellkerne mit NY-Markierung auf. Nur 2 Ganglienzellen in dieser Retina waren mit RITC markiert. Sie lagen zwar im Bereich der NY-Markierung, wiesen aber keine Doppelmarkierung auf.

Injektion in den Colliculus superior homolateral zum untersuchten Auge:

Hier gelang die massive Anfärbung von großen Teilen der dorsalen linken Retina durch Injektion von NY in den linken Colliculus superior bei einer pigmentierten Ratte am 2. Tag nach der Geburt. Die RITC-Markierung durch Injektion in die rechte Retina umfaßte 45 Ganglienzellen, 11 davon lagen im Gebiet der NY-Markierung. Keine dieser Zellen war doppelt markiert.

Neugeborene Kaninchen

Injektion in den Colliculus superior contralateral zum untersuchten Auge:

Am 2. Tag nach der Geburt erhielt ein albinotisches Kaninchen eine NY-Injektion in den linken Colliculus superior, sowie eine RITC-Injektion in das linke Auge. In der rechten Retina fand sich im oberen naso-ventralen Bereich ein eng umschriebenes Gebiet mit Ganglienzellen, deren Kerne NY-Markierung aufwiesen. Außerhalb dieses Bereiches fanden sich einige wenige verstreut liegende NY-markierte Kerne. RITC-Markierung wurde nicht gefunden.

Injektion in den Colliculus superior homolateral zum untersuchten Auge:

5 weitere albinotische Kaninchen wurden mit NY in den rechten Colliculus superior und mit RITC in das linke Auge injiziert. In drei Fällen fanden sich eng umschriebene Gebiete in der rechten Retina, die NY-Markierung aufwiesen, wie im ersten Fall aber auch einige wenige Kerne außerhalb dieses Gebietes. Die Anzahl der RITC-markierten Ganglienzellen betrug 2, 4 und 16. In einem Fall wurden zwei Ganglienzellen gefunden, die sowohl einen NY-markierten Zellkern als auch RITC-markiertes Plasma aufwiesen. Eine dieser Zellen lag innerhalb des Hauptgebietes der NY-Markierung und eine ausserhalb. Die letzte Retina in dieser Serie wies 7 mit RITC retrograd markierte Ganglienzellen und ein markiertes Axon auf, jedoch nur ganz vereinzelte NY-markierte Kerne. Drei der Ganglienzellen mit RITC-markiertem Plasma hatten einen mit NY markierten Kern (Abbildungen 15 und 16). Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8: Doppelinjektionen bei neugeborenen Ratten und Kaninchen. R=Ratte, K=Kaninchen, a=albinotisch, p=pigmentiert. In der Spalte "Retina" bzw. "Coll. s." sind die jeweiligen Injektionsseiten angegeben. Unter "RITC" bzw. "Doppel" steht die Anzahl der mit RITC-markierten, retino-retinal projizierenden Zellen bzw. die der doppelt markierten Zellen.

Spezies	a/p	Retina	Coll. s.	RITC	Doppel
R	p	li	re	60	0
	p	re	re	45	0
	p	li	li	2	0
K	a	li	li	0	0
	a	li	re	2	0
	a	li	re	0	0
	a	li	re	7	3
	a	li	re	16	2
	a	li	re	4	0

Entfernung einer Retina

Neugeborene Ratten

Die Versilberung einiger weniger normaler, nicht degenerierender Axone neben der Masse degenerierender Axone ist für die Methode nach Nauta (1957) charakteristisch. Die so reagierten Gefrierschnitte der contralateralen Retinae zeigten aber weder Anzeichen von Versilberung normaler Axone, noch Anzeichen von Imprägnation degenerierender Strukturen. Schneider (1969) beschreibt dieses Phänomen und schlägt deshalb eine modifizierte Methode vor. Mit deren Hilfe gelang zwar eine unspezifische Versilberung unterschiedlicher neuronaler Strukturen, degenerierende Axone oder Neurone waren aber nicht mit Sicherheit zu identifizieren. Eine dritte Methode nach Heimer (1970) arbeitet mit Semi-Dünnschnitten. In Horizontalschnitten durch den "optic disc" der Retina gelang hier zwar die Darstellung von Glia und teilweise von Gefäßen, degenerierende Strukturen waren aber nicht zu finden. Bei der Versilberung einer Retina nach Glees (1946), die alle neuronalen Strukturen darstellt, erwiesen sich die nach Stückeimprägnation herzustellenden Paraffinschnitte von zu geringer Qualität um bei den sehr dünnen Axonen der Neugeborenen mit Sicherheit Degeneration erkennen zu können. Alle angewendeten Methoden führten damit nicht zur Darstellung degenerierender Axone im contralateralen Nervus opticus oder der contralateralen Retina nach Entfernung der anderen Retina.

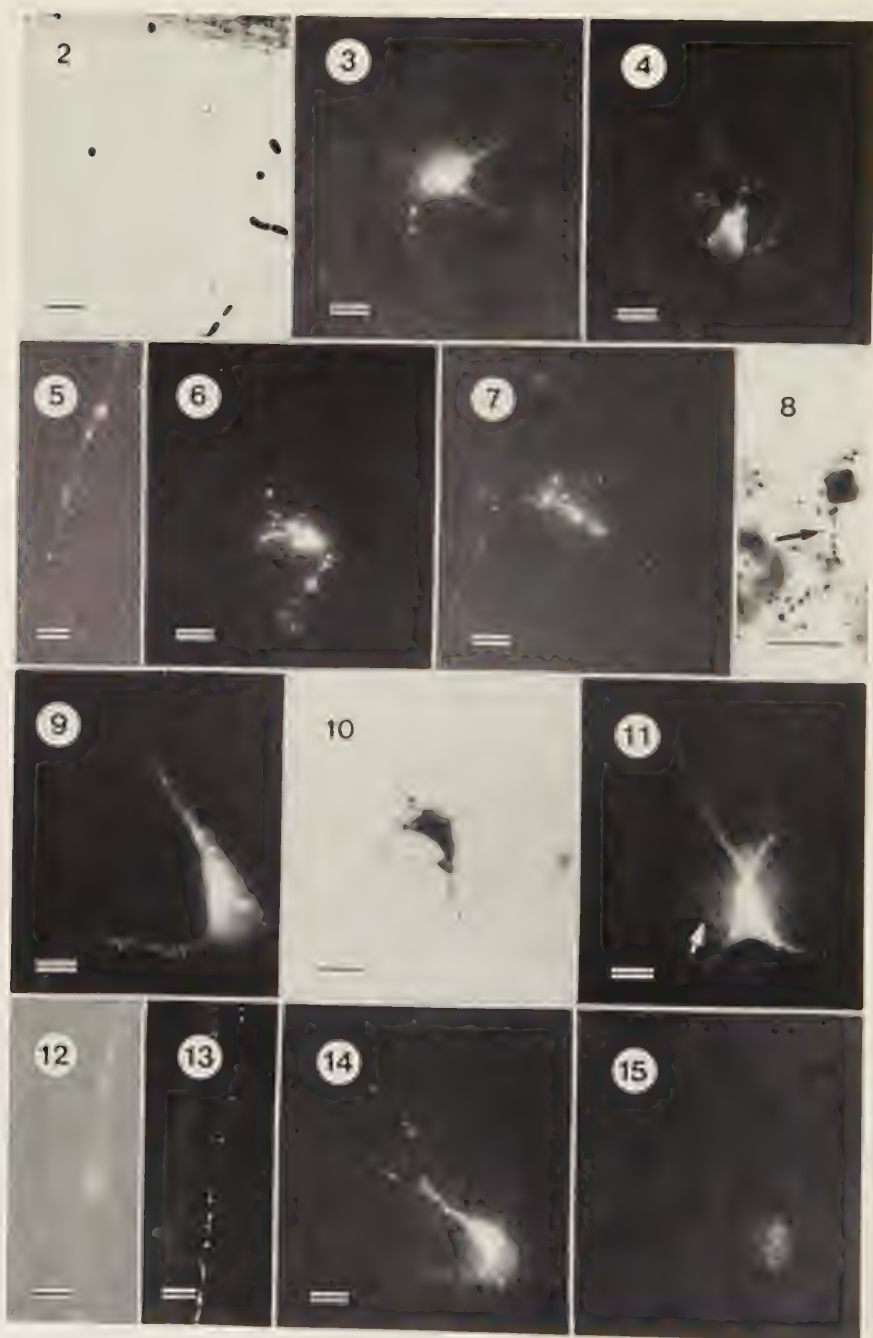
Neugeborene Kaninchen

Die hier angewendete Methode nach Rager (1979) stellt alle neuronalen Strukturen dar. Sie gelingt bei neugeborenen Tieren ausgezeichnet. Serienschnitte durch Retina und Chiasma der 3 Tiere, denen am ersten Tag nach der Geburt eine Retina entfernt worden war, wurden sorgfältig untersucht. Sowohl in der contralateralen Retina als auch im contralateralen Nervus opticus waren keine Strukturen zu finden, die eindeutig als Degenerationserscheinung infolge der Entfernung der Retina zu identifizieren gewesen wären.

Adulte Ratten

In Gefrierschnitten durch das Chiasma und die beiden optischen Nerven von 3 adulten, albinotischen Ratten, denen die Retina entfernt worden war, fanden sich nach 4, 6 und 10 Tagen Überlebenszeit sichere Anzeichen von Degeneration wenigstens je einer Faser im contralateralen Nervus opticus (Abbildung 19). In den Schnitten durch das Chiasma der nicht operierten Tiere fanden sich keine Anzeichen für Degeneration.

Abbildungen 2-15



Legenden zu den Abbildungen 2 bis 15

Abbildung 2: Horizontalschnitt durch das Chiasma und den contralateralen Nervus opticus einer 2 Tage alten Albino-Ratte nach Injektion von BHRP. Nachweis mit TMB. Chiasma (oben), markierte Axone im contralateralen Nervus opticus. Maßstrich = 20 μm .

Abbildung 3: Retrograd markierte Ganglienzelle in der Retina einer 2 Tage alten Albino-Ratte nach Injektion von RITC. Maßstrich = 10 μm .

Abbildung 4: Retrograd markierte Ganglienzelle in der Retina einer 3 Tage alten Albino-Ratte nach Injektion von RITC. Maßstrich = 10 μm .

Abbildung 5: Markiertes Axon in der Retina einer 2 Tage alten Albino-Ratte nach Injektion von RITC. Maßstrich = 10 μm .

Abbildungen 6 und 7: Retrograd markierte Ganglienzellen in den Retinae von 2 Tage alten Albino-Ratten nach Injektion von Rhodamin-markierten Latexkügelchen. Maßstriche = 10 μm .

Abbildung 8: Autoradiogramm eines Tangential-Schnittes durch die Retina einer 3 Tage alten Albino-Ratte. Der Pfeil zeigt auf eine Reihe von Silberkörnchen über der Ganglienzellfaserschicht, die vermutlich von einem anterograd markierten Axon hervorgerufen wurde. Maßstrich = 10 μm .

Abbildung 9: Retrograd markierte Ganglienzelle in der Retina eines 2 Tage alten pigmentierten Kaninchens nach Injektion von RITC. Meßstrich = 10µm.

Abbildung 10: Retrograd markierte Ganglienzelle in der Retina eines 3 Tage alten pigmentierten Kaninchens nach Injektion von HRP. Nachweis mit TMB. Meßstrich = 20µm.

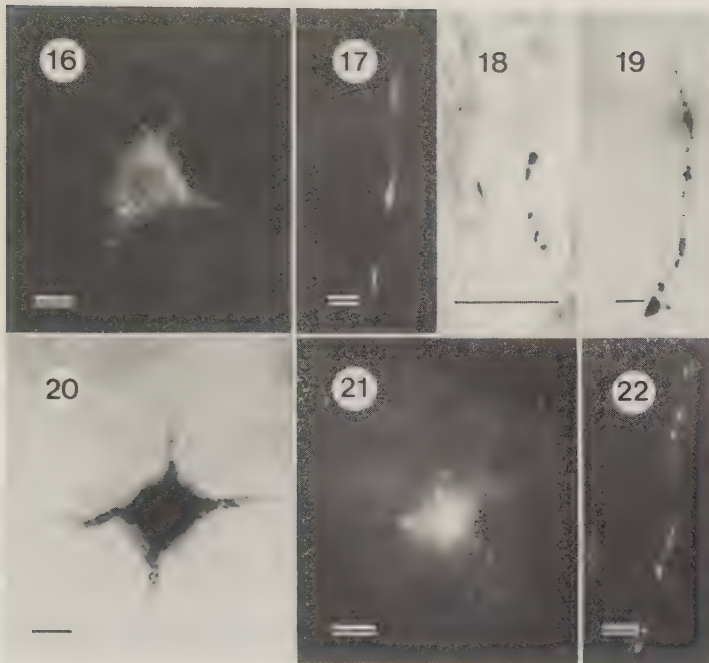
Abbildung 11: Retrograd markierte Ganglienzelle in der Retina eines 3 Tage alten Albino-Kaninchens nach Injektion von RITC. Der Pfeil zeigt auf das Axon. Meßstrich = 10µm.

Abbildung 12: Markiertes Axon in der Retina eines 3 Tage alten Albino-Kaninchens nach Injektion von RITC. Meßstrich = 10µm.

Abbildung 13: Markiertes Axon im contralateralen Nervus opticus eines 4 Tage alten pigmentierten Kaninchens nach Injektion von RITC. Meßstrich = 10µm.

Abbildung 14 und 15: Doppelt markierte Ganglienzelle in der Retina eines 3 Tage alten Albino-Kaninchens nach Injektion von RITC in ein Auge und NY in einen Colliculus superior. Abbildung 14 zeigt das RITC-markierte Plasma, Abbildung 15 zeigt den NY-markierten Kern dieser Zelle. Meßstrich = 10µm.

Abbildungen 16-22



Legenden zu den Abbildungen 16 bis 22

Abbildung 16: Retrograd markierte Ganglienzelle in der Retina einer adulten Albino-Ratte nach Injektion von RITC. Maßstrich = 10µm.

Abbildung 17: Markiertes Axon mit Beadings in der Retina einer adulten pigmentierten Ratte nach Injektion von RITC. Maßstrich = 10µm.

Abbildung 18: Degenerierendes Axon im Nervus opticus einer adulten Albino-Ratte, contralateral zur entfernten Retina. Überlebenszeit nach Operation = 10 Tage, Nachweis nach Nauta-Laidlow. Maßstrich = 10µm.

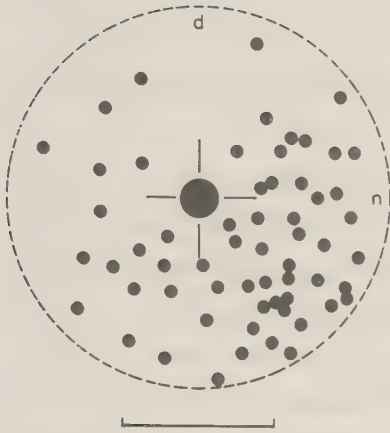
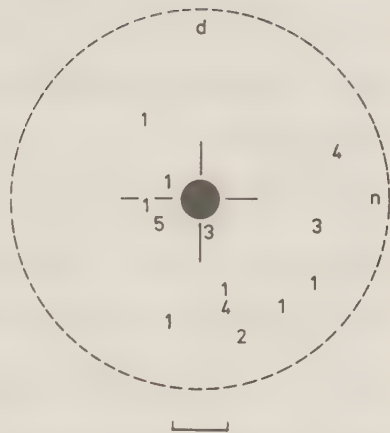
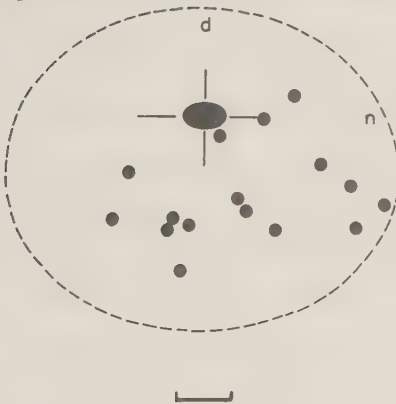
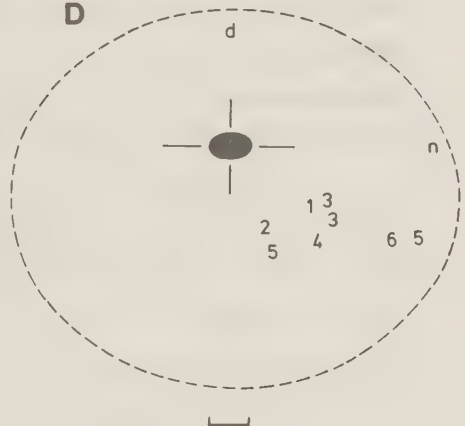
Abbildung 19: Markiertes Axon in der Retina eines adulten Kaninchens nach Injektion von HRP. Nachweis mit TMB. Maßstrich = 10µm.

Abbildung 20: Retrograd markierte Ganglienzelle in der Retina eines adulten Kaninchens nach Injektion von HRP. Nachweis mit para-Phenylendiamin/ Brenzcatechin. Maßstrich = 10µm.

Abbildung 21: Retrograd markierte Ganglienzelle in der Retina eines adulten Kaninchens nach Injektion von RITC. Maßstrich = 10µm.

Abbildung 22: Markiertes Axon im contralateralen Nervus opticus eines adulten Kaninchens nach Injektion von RITC. Maßstrich = 10µm.

Abbildung 23 A-D

A**B****C****D**

Legende zu Abbildung 23

Abbildung 23: Verteilung der retino-retinal projizierenden Ganglienzellen nach Injektion von RITC oder HRP in das contralaterale Auge. d= dorsal, n= nasal. Meßstriche=2mm.

A. Albino-Ratte, 2 Tage alt. Die Punkte geben die Lage der mit RITC retrograd markierten Ganglienzellen auf der Retina an.

B. Zusammengefaßte Daten von 5 adulten Ratten. Die Lage der mit RITC oder mit HRP retrograd markierten Ganglienzellen ist durch Zahlen angegeben. Zellen mit derselben Zahl wurden in einer Retina gefunden.

C. Albinotisches Kaninchen, 3 Tage alt. Die Punkte geben die Lage der mit RITC retrograd markierten Zellen an.

D. Zusammengefaßte Daten von 6 adulten Kaninchen. Die Lage der mit RITC oder mit HRP retrograd markierten Ganglienzellen ist durch Zahlen angegeben. Zellen mit derselben Zahl wurden in einer Retina gefunden.

Diskussion

Die retino-retinale Projektion - ein Artefakt?

Bunt und Lund (1981) zeigten zum ersten Male, daß sich bei der Ratte nach Injektion von HRP in den Glaskörper eines Auges, im anderen Auge markierte Ganglienzellen nachweisen lassen. Der naheliegende Schluß auf retino-retinale Axone wurde hauptsächlich durch zwei weitere Beobachtungen gefördert: In Schnitten durch den Nervus opticus der dem Auge gegenüberliegenden Seite fanden sich markierte Axone; gleiches war zu beobachten, wenn das Auge dieser Seite entfernt worden war. Dieses letzte Experiment galt dem Ausschluß der Möglichkeit von Tracer-übertritt im Chiasma. Diffusion von HRP aus einem Axon, in dem es transportiert wird, ist prinzipiell aber nicht auszuschließen. Gerade im Chiasma, in dem die Axone beider Augen eng miteinander verflochten sind und gerade bei Neugeborenen, deren Nervenfasern noch kaum myelinisiert sind, könnte genügend freies HRP zur Verfügung stehen, um über die Axone des nicht injizierten Auges retrograd Ganglienzellen zu markieren. Wenn aber infolge der Durchtrennung des Nervus opticus der retrograde Transport zum nicht injizierten Auge unterbunden wird, so kann angenommen werden, daß markierte Axone in diesem Nervus opticus zu Ganglienzellen im anderen, dem injizierten Auge gehören.

Eine weitere Möglichkeit zur Aufnahme von freiem HRP bestünde an den Zielorten der Projektion, wo aufgrund stark sich aufzweigender Axonendigungen ebenfalls große Austauschflächen zur Verfügung stehen. Auch hier kann retrograder Transport durch Enucleation ausgeschlossen werden. Nicht ausgeschlossen werden kann mit dieser Methode anterograder Transport freien Tracers durch retinale Afferenzen. Der Tracer würde im injizierten Auge von Ganglienzellen aufgenommen werden, durch das Axon in ein zentrales Kerngebiet gelangen, aus den Axonterminalen heraus diffundieren um schließlich von Neuronen aufgenommen zu werden, die Axone zum anderen Auge haben. Diese Fasern würde man auch nach Enucleation markieren können. Die Existenz einer solchen Verbindung ist allerdings nur bei Vögeln nachgewiesen (Cowan et al. 1961, Holden 1966). Bei Säugetieren ist sie umstritten. Hinweise für ein Vorhandensein solcher Fasern erbrachten beim Affen Honrubia und Elliot (1970) und Brooke et al. (1965), beim Hund Terubayashi et al. (1983), bei der Katze Granit (1955), Brooke et al. (1965) und Lin (1973), beim Kaninchen Dodt (1956), Cragg (1962) und Luciano et al. (1971), bei der Ratte Schober (1974), Itaya (1980) und Hoogland et al. (1985). Eine Übersicht gibt van Hasselt (1972/73). Gegen das Vorhandensein retinopetaler Fasern sprechen die Beobachtungen von Brindley und Hamasaki (1961 und 1962) bei der Katze, sowie von Weidner et al. (1983) und Schnyder und Künzle (1984) bei der Ratte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen durch mehrere unterschiedliche experimentelle Ansätze, daß Übertritt von Tracer, das Spill-over, in Hinsicht auf die grundsätzliche Existenz der retino-retinalen Projektion als auch bezüglich ihres Umfanges keine Rolle spielt. Der Vergleich der Anzahl retrograd markierbarer Ganglienzellen nach Injektion von nicht diffusiblen Latexkügelchen, RITC und FG bei neugeborenen Ratten zeigt hier eine retino-retinale Projektion, die von bis zu 150 Ganglienzellen ausgeht. Die großen Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen in der Anzahl markierbarer Ganglienzellen erscheinen bei allen verwendeten Tracern. Sie hängen wohl von dem mehr oder weniger guten Gelingen der Injektion ab. Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, daß immer einige der Ganglienzellen weniger Tracer aufweisen als die meisten anderen. Die Probleme bei der Verwendung von BHRP und den Latexkügelchen unterstreichen das: Erst wenn die Injektion direkt in die Retina erfolgt, können diese Stoffe im anderen Auge nachgewiesen werden. Zum einen ist es wahrscheinlich die Membrana limitans interna, die für die Tracer eine Diffusionsbarriere darstellt, wobei die Latexkügelchen zu groß sind, um in nennenswertem Umfang zu passieren. Für das BHRP kommt noch ein anderer Mechanismus in Frage. Es bindet aufgrund der Eigenschaften der B-Untereinheit des Choleratoxins an das Gangliosid GM₁ der Zellmembran. Da dieses Gangliosid nicht nur bei Neuronen vorkommt, könnte das BHRP schon im Glaskörper oder an die Zellmembranen der Glia gebunden werden, bevor es Gelegenheit zum Kontakt mit den Ganglienzellen erhält.

Einen weiteren experimentellen Ansatz zum Ausschluß von Spill-over stellt die Verwendung von tritiiertem Leucin dar. Es wird am Injektionsort aufgenommen, in Proteine eingebaut und in dieser Form transportiert (Cowan et al. 1972). Da nur im Perikaryon Proteine in großer Menge synthetisiert werden, läßt sich mit Hilfe dieser Methode praktisch nur anterograder Transport zu den Terminalen beobachten. Tatsächlich fand sich nach Augeninjektion bei neugeborenen Ratten nur in einem von 5 Fällen in der contralateralen Retina eine Stelle, die in zwei aufeinander folgenden Schnitten spezifische Aktivität erkennen ließ. Allerdings, wie Schnitte durch das Chiasma von neugeborenen Ratten zeigen, sind mit Hilfe der Autoradiographie bei entsprechender Hintergrundsaktivität, einzelne markierte Axone nicht sicher zu erkennen, weil sie zu dünn sind.

Durch Degenerationsmethoden kann eine axonale Verbindung auch ohne Verwendung eines Tracers nachgewiesen werden. Zwar mißlang aus methodischen Gründen bei den Neugeborenen die Darstellung degenerierender Fasern im contralateralen Nervus opticus nach Entfernung einer Retina, doch konnten bei adulten Ratten eindeutige Anzeichen degenerierender Fasern gefunden werden.

Da HRP also durchaus als Tracer zum Nachweis der retino-retinalen Projektion geeignet ist und gleiches für mindestens 2 Fluoreszenzfarbstoffe gilt (RITC und FG), können einige weitere Beobachtungen verschiedener Autoren neu bewertet werden. Bei der neugeborenen Ratte haben außer Bunt und Lund (1981) und Bunt et al. (1983) auch Perry et al. (1983) nach Augeninjektion in der anderen Retina markierte Ganglienzellen gefunden, ohne sich jedoch damit näher zu beschäftigen. Gleiches beschreibt O'Leary (1987). Godement et al. (1984) berichten von einer Beobachtung bei der Maus. Sie fanden in einem Fall am 14. Tag der Embryonalentwicklung nach Augeninjektion mit HRP retrograd markierte Ganglienzellen in der contralateralen Retina.

Beim Hühnchen wurden von E7-E9, vereinzelt bis E15 nach Augeninjektion mit Weizenkeim-Agglutinin-konjugiertem HRP im Chiasma markierte Axone gefunden, die in den contralateralen Nervus opticus einwuchsen (O'Leary et al. 1983). Gleiches beschreibt Halfter (1987) beim Huhn und der Wachtel nach Injektion von Biotin-Derivaten als Tracer. In allen vorstehenden Fällen ist von der Existenz retino-retinaler Axone auszugehen.

Die retino-retinale Projektion beim neugeborenen Kaninchen

In der vorliegenden Arbeit wurde die retino-retinale Projektion bei einer zweiten Spezies, dem Kaninchen, genauer untersucht. Die Ergebnisse unterscheiden sich von denen bei der neugeborenen Ratte in zweierlei Hinsicht. Zum einen haben Kaninchen postnatal nur einige wenige retino-retinal projizierende Ganglienzellen, in der Regel weniger als 10. 16 Zellen waren die höchste beobachtete Anzahl. Zum anderen konnte im Verlauf der ersten Woche nach der Geburt keine Reduktion in der Anzahl der markierbaren Zellen festgestellt werden, ganz im Gegensatz zu den Befunden von Bunt und Lund (1981) und Bunt et al. (1983) bei neugeborenen Ratten. Dort wird das Auftauchen der Projektion am 17. Tag der Embryonalentwicklung beschrieben, die nachfolgende Zunahme des Umfangs, ein Höhepunkt am Tag der Geburt, die Abnahme des Umfanges während der ersten postnatalen Tage und das Verschwinden am 5. Tag nach der Geburt.

Da das neugeborene Kaninchen eine mit der neugeborenen Ratte vergleichbare Gesamtzahl retinaler Ganglienzellen hat (Dreher et al. 1983; Vaney und Hughes 1976; Provis 1979), muß es sich um einen für die beiden Spezies spezifischen Unterschied handeln. Entweder haben Kaninchen eine retino-retinale Projektion geringeren Umfangs als Ratten, oder die Kaninchen sind in dieser Hinsicht bei der Geburt weiter entwickelt, sodaß wir postnatal nur noch die Reste

einer vorher größeren Projektion beobachten können. Für diese letzte Annahme spricht die Reduktion der Projektion bei Ratten auf ein dem bei neugeborenen Kaninchen sehr ähnliches Niveau. Es ist gerade dieser Rest von 1-2 Zellen pro Retina, der bei beiden Spezies auch noch nach der Geschlechtsreife beobachtet werden kann.

RITC als Tracer für die retino-retinale Projektion

RITC wurde als Tracer von Bonhoeffer und Huf (1980) und Thanos und Bonhoeffer (1983) beim Hühnchen eingeführt. Seine Eigenschaften wurden von Thanos et al. (1987) untersucht. Ein direkter Vergleich von RITC mit HRP, dessen Eigenschaften durch eine Vielzahl von Arbeiten inzwischen gut bekannt sind, wurde aber bisher nicht durchgeführt.

Nach einer Kontrolle der Diffusionseigenschaften durch Vergleich mit den Latexkügelchen bei neugeborenen Ratten, wurde dieser Fluoreszenzfarbstoff auch bei neugeborenen Kaninchen verwendet. Der Vergleich mit HRP bezüglich der Anzahl retrograd markierbarer Ganglienzellen am 2. und 3. Tag nach der Geburt zeigte hier keine deutlichen Unterschiede, gleiches gilt für die Ergebnisse bei den erwachsenen Tieren. Für die Untersuchung der retino-retinalen Projektion kann also RITC an die Stelle von HRP treten.

HRP als Tracer besitzt aber gegenüber RITC einen großen Vorteil: Das Reaktionsprodukt bleibt in Präparaten lange Zeit erhalten, während RITC bei Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop schon nach wenigen Minuten ausbleicht. Andererseits sind, wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, nur mit RITC in befriedigendem Maße anterograd und retrograd die dünnen Axone neugeborener Säugetiere zu färben. Weitere Vorteile sind die kräftige Farbe der Substanz bei Tageslicht, was die Kontrolle der Injektion sehr erleichtert, das Wegfallen einer Nachweisreaktion und nicht zuletzt der weitaus geringere Preis des RITC.

Die retino-retinale Projektion bei adulten Ratten und Kaninchen

Auch bei adulten Ratten und Kaninchen konnten nach Augeninjektion retrograd markierte Ganglienzellen in der gegenüber liegenden Retina nachgewiesen werden. Faßt man die Ergebnisse bei beiden Spezies zusammen, so kommt man im Durchschnitt auf nicht ganz eine Zelle je untersuchtem Tier. Auch wenn man die bei den neugeborenen Ratten gemachten Beobachtungen über die großen interindividuellen Schwankungen mit einbezieht, so lassen sich bei erwachsenen Tieren nicht mehr als einige wenige retino-retinale Ganglienzellen vermuten. Die maximal gefundene Anzahl von 7 Zellen bei einer albinotischen Ratte erscheint im Vergleich zu den anderen Tieren schon ungewöhnlich hoch.

Experimente mit längeren Überlebenszeiten nach Tracer-Injektion führten nicht zu einer erhöhten Anzahl markierter Zellen, obwohl bei der enormen Menge injizierten Tracers die Verteilung in der hinteren Augenkammer als auch die Gesamtmenge des hinter der Diffusionsbarriere Membrana limitans interna zur Verfügung stehenden Tracers vergrößert gewesen sein dürfte. Einschränkend muß dazu allerdings bemerkt werden, daß es sich hier nicht um ein starres physikalisches Diffusionsmodell handelt, sondern um das Zusammenspiel vieler Elemente, wie etwa der pinocytotischen Aktivität von Müller-Zellen, von Makrophagen oder der Reaktion des Tracers z.B. mit dem Glaskörper. Die bei adulten Ratten durchgeführten Degenerationsexperimente weisen aber ebenfalls auf das Vorhandensein von nur einigen wenigen retino-retinalen Ganglienzellen hin.

Die vorliegenden Ergebnisse bei erwachsenen Tieren stehen im Gegensatz zu den Beobachtungen von Bunt und Lund (1981) und Bunt et al. (1983). Dort wird das völlige Verschwinden retino-retinal projizierender Ganglienzellen bei Ratten spätestens am 5. Tag nach der Geburt beschrieben. Diese Diskrepanz läßt sich aus der Anwendung unterschiedlicher Präparationsmethoden erklären. Die angeführten Autoren verwendeten lediglich Schnitte durch das gesamte Auge, während hier Wholemounts der Retina untersucht wurden, in denen es leichter ist, einzelne markierte Zellen zu finden.

Einige der bisher als Hinweise auf das Vorliegen zentrifugaler Fasern zur Retina geltenden Beobachtungen lassen sich durch retino-retinale Fasern erklären. Nach Durchtrennung des Nervus opticus wurde in dem Abschnitt zwischen Läsion und Auge und in der Retina anterograde Degeneration festgestellt. Es handelt sich um die Arbeiten von Brooke (1965) beim Affen und der Katze und von Lin (1973) ebenfalls bei der Katze. Auch bei den Beobachtungen sich verzweigender Axone in der Affenretina von Honrubia und Elliot (1970), sowie einer myelinisierten Faser in der inneren plexiformen Schicht der Retina des Kaninchens von Luciano et al. (1971) könnte es sich um retino-retinale Axone handeln. Allerdings besteht hier noch eine weitere Möglichkeit der Erklärung. Es könnte sich ebenso um rekurrente Axonkollateralen retinaler Ganglienzellen handeln, wie sie von Dacey (1985) bei der Katze beschrieben wurden.

Sind die retino-retinalen Axone Irrläufer?

Die Entdeckung retino-retinal projizierender Ganglienzellen bei erwachsenen Ratten und Kaninchen wirft verstärkt die Frage nach einer möglichen Funktion auf. Innocenti (1982) sieht die transienten Projektionen als Grundlage einer gewissen Plastizität nach Verletzungen oder sonstigen Störungen in der Gehirnentwicklung. Einige wenige Zellen, wie bei neugeborenen Kaninchen oder bei den erwachsenen

Tieren hätten dann aber wenig Sinn. Ebbesson (1980) sieht sie sogar als entwicklungsgeschichtliches Relikt. Eine dritte Möglichkeit ist die Funktion transienter Fasern als Leitstruktur, an der andere Fasern entlangwachsen. Sie wird für eine transiente retino-tectale Projektion beim Hühnchenembryo diskutiert, an der die Fasern vom Nucleus isthmo-opticus zur richtigen Retina finden (O'Leary und Thanos 1985). Für eine solche Funktion gibt es allerdings bei der retino-retinalen Projektion bisher keinerlei Anhaltspunkte. Die Zellen bei den adulten Tieren hätten auch nach dieser Vorstellung keinerlei Funktion mehr. Zuletzt besteht noch die Möglichkeit völliger Funktionslosigkeit. Retino-retinale Axone wären danach einfach im Chiasma fehlgeleitete Fasern. Dieser Fehler während der Entwicklung, es handelt sich um 150 von ca 200.000 Ganglienzellen (Perry et al. 1983; Horsburgh und Sefton 1987), wird anschliessend auf die bekannte Weise beseitigt: Ganglienzellen, die keine "richtige" Verbindung in den zentralen Kerngebieten haben, verschwinden. Handelt es sich um eine "falsche" Verbindung über eine von zwei oder mehreren Axonkollateralen, so wird diese beseitigt, ohne daß es zum Ganglienzelltod kommen muß (Cowan et al. 1984; Zur Übersicht: Cowan 1979).

Wie bei anderen Spezies auch (zum Überblick: Guillery 1986), besitzt die albinotische Ratte (Lund 1965) und das albinotische Kaninchen (Giolli und Guthrie 1969) im Vergleich zu pigmentierten Individuen derselben Spezies

eine verminderte homolaterale retinale Projektion und mehr Fasern, die zur contralateralen Seite ziehen. Shatz und Kliot (1982) und Kliot und Shatz (1985) beobachteten bei albinotischen Katzen, daß dies die Folge einer veränderten Wachstumsrichtung embryonaler Ganglienzellaxone ist. Nach den quantitativen Untersuchungen von Guillery et al. (1973) ist bei Mäusen die homolaterale Projektion um etwa ein Drittel reduziert. Besteht die retino-retinale Projektion aus Irrläufern, so könnte man möglicherweise bei albinotischen Tieren, mit ihrer Störung in der Ordnung retinofugaler Axone, auch mehr abirrende Axone ins andere Auge finden.

Bunt und Lund (1981) beobachteten bei Ratten keinen solchen Effekt. In der vorliegenden Arbeit wurden 2 Tage alte albinotische und pigmentierte Kaninchen miteinander verglichen. Zwar zeigten die pigmentierten Kaninchen im Durchschnitt etwas weniger markierte Zellen, doch enthielten mehr Retinae als bei albinotischen Tieren überhaupt solche Zellen. Der Vergleich albinotischer und pigmentierter erwachsener Ratten und Kaninchen führt zusätzlich noch einmal die Rolle der großen individuellen Schwankungen in der Anzahl markierter Zellen vor Augen. Während sich bei Ratten leicht ein positiver Albino-Effekt ablesen ließe, ist es bei Kaninchen umgekehrt. Hier fanden sich bei albinotischen Tieren weniger markierte Zellen. Zusammenfassend läßt sich sagen: Die Störung in der Ordnung der retinofugalen Projektion bei Albinismus wirkt sich auf die retino-retinale Projektion nicht in bemerkenswertem Maße aus.

Bohn (1986) beschreibt für die transiente retino-retinale Projektion während der Regeneration beim Frosch einen Mechanismus, der das Abirren der Axone erklären könnte. Junge, neu auswachsende Fasern meiden den zentralen Bereich des Nervus opticus und wachsen im Chiasma weiter an der Pia mater entlang. Einige gelangen so zwangsläufig in den contralateralen Nervus opticus. Über die Rolle von pigmentierten Epithel als Leitstruktur für retinale Ganglienzellaxone berichten auch Silver und Sapiro (1981).

Durch direkten Kontakt zu benachbarten Fasern finden nach Goldberg (1977) und Goldberg und Frank (1979) die Axone retinaler Ganglienzellen bei der Maus ihren Weg. Thanos et al. (1984) berichten über ein "nerve cell adhesion molecule" (NCAM) beim Hühnchen, das mit dem gerichteten Wachstum der Axone im visuellen System zu tun hat. Injiziert man einen Antikörper gegen NCAM, das anti-NCAM Fab', so kommt es nicht nur zur Störung in der Entwicklung der retino-tectalen Projektion (Thanos et al. 1984), sondern auch zu einer größeren Anzahl retino-retinal wachsender Axone (Thanos, persönliche Mitteilung). Diese Beobachtung unterstützt ebenfalls die Vermutung, daß es sich bei der transienten retino-retinalen Projektion um fehlgeleitete Axone handelt.

Der Abbau transienter Projektionen

Neben den Bedingungen der Entstehung ist der Mechanismus des Abbaues der transienten Projektionen von ganz besonderem Interesse, denn er ist es, der für die feinere Abstimmung der Verschaltungen im Gehirn zuständig ist. Die Rolle von Zelltod in konkreten Fällen ist von Rager (1978), Rager und Rager (1978), Jeffery und Perry (1982), Dreher et al. (1983), Insausti et al. (1984), Ehrlich und Mills (1985), Lia et al. (1986) und Edwards et al. (1986) beschrieben. Besitzt das betreffende Neuron eine Axonkollaterale, die Teil einer persistierenden Projektion ist, so kann es überleben, wie O'Leary et al. (1981), Stanfield et al. (1982), Stanfield und O'Leary (1983), Panneton und Tolbert (1985), Tolbert und Panneton (1984), Stanfield (1984), Clarke und Innocenti (1985), Stanfield und O'Leary (1985) und O'Leary und Stanfield (1986) gezeigt haben. Hier wird also nicht das Neuron, sondern nur eine Kollaterale eliminiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß es sich zumindest bei einigen der retino-retinal projizierenden Ganglienzellen des Kaninchens um solche Zellen handelt. Sie haben je eine Kollaterale in die contralaterale Retina und zum Colliculus superior. Es erscheint möglich, daß es diese zentrale Kollaterale ist, die das Überleben der Zellen garantiert und damit in wenigen Fällen auch das persistieren der "falschen" Verbindung ermöglicht. Wikler

et al. (1986) berichten dagegen von Neuronen mit transienten Verbindungen, die trotz des Besitzes von Kollateralen zu einem "richtigen" Zielgebiet eliminiert werden.

Zur Entscheidung, ob eine Verbindung erhalten bleiben soll oder abgebaut werden muß, trägt offensichtlich auch eine Konkurrenz unterschiedlicher Axone um ein Zielgebiet bei. Entfernt man nämlich diejenige Projektion, die normalerweise persistiert, so können andere, sonst transiente Verbindungen überleben. Solche Experimente sind von So und Schneider (1978), Perry und Cowey (1979), Perry und Cowey (1982), Kato et al. (1985), Mooney et al. (1985), Panneton und Tolbert (1985), Panneton (1986) und von Reese (1986) beschrieben. Da Campell et al. (1984) und Jeffery et al. (1984) von Synapsenbildung transienter Projektionen berichten, kann dies aber nicht der alleinige Mechanismus sein. Es sei denn, was die angeführten Autoren nicht ausschliessen, nur einige wenige Axone transienter Projektionen bilden Synapsen. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß die lichtmikroskopisch zu erkennenden Beadings der untersuchten retino-retinalen Axone in der Schicht der Ganglienzellaxone liegen und dort mit großer Wahrscheinlichkeit keine Synapsen bilden. Es kann aber nach wie vor nicht ausgeschlossen werden, daß einige dieser Axone, wie von Bunt und Lund (1981) beschrieben, in die innere plexiforme Schicht reichen und dort Synapsen bilden. Vielleicht können solche Fasern überleben und sie sind es, die in der vorliegenden Arbeit bei erwachsenen Tieren beobachtet werden.

Die Rolle der Makrophagen beim Abbau transienter Projektionen ist ebenfalls ungeklärt. Sie tauchen oft in großer Anzahl um die Bündel der Projektionen auf, um nach deren Eliminierung wieder zu verschwinden (Innocenti et al. 1983a,b; Killackey 1984; Nachbin et al. 1984). Elektronenmikroskopisch ist dabei ein Einschließen von Axonen durch Makrophagen zu sehen (Ling 1976). Ob die Makrophagen einfach nur degenerierende Strukturen beseitigen oder etwa selbst aktiv an der Beseitigung der transienten Projektion beteiligt sind, ist ungeklärt. Möglicherweise können sie noch intakte Strukturen, die aber beseitigt werden sollen, an besonderen Eigenschaften der Zellmembran erkennen und leiten dann deren Abbau ein.

Literatur

Bentivoglio, M., Kuypers, H.G.J.M., Catsman-Berrevoets, C.E.: Retrograde neuronal labeling by means of Bisbenzimidazole and Nuclear Yellow (Hoechst S 769121). Measures to prevent diffusion of the tracers out of retrograde NY labeled neurons. *Neurosci. Lett.* 18, 19-24 (1980)

Bentivoglio, M., Kuypers, H.G.J.M., Catsman-Berrevoets, C.E., Loewe, H., Dann, O.: Two new fluorescent retrograde neuronal tracers which are transported over long distances. *Neurosci. Lett.* 18, 25-30 (1980)

Bohn, R.C., Stelzner, D.J.: Aberrant retino-retinal pathway during early stages of regeneration in adult *Rana pipiens*. *Brain Res.* 160, 139-144 (1979)

Bohn, R.C., Stelzner, D.J.: The aberrant retino - retinal projection during optic nerve regeneration in the frog. I. Time course of formation and cells of origin. *J. Comp. Neurol.* 196, 605-620 (1981a)

Bohn, R.C., Stelzner, D.J.: The aberrant retino - retinal projection during optic nerve regeneration in the frog. II. Anterograde labeling with horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 196, 621-632 (1981b)

- Bohn, R.C., Stelzner, D.J.: The aberrant retino - retinal projection during optic nerve regeneration in the frog. III. Effects of crushing both nerves. J. Comp. Neurol. 196, 633-643 (1981c)
- Bohn, R.C.: Axon-glial interactions and 'misrouting' of regenerating optic nerve axons in adult frogs. Anat. Rec. 214, 13A (1986)
- Bonhoeffer, F., Huf, J.: Recognition of cell types by axonal growth cones in vitro. Nature 288, 162-164 (1980)
- Brindley, G.S., Hamasaki, D.I.: Histological evidence against the view that the cat's optic nerve contains centrifugal fibres. J. Physiol. Lond. 163, 25P-26P (1961)
- Brindley, G.S., Hamasaki, D.I.: Evidence that the cat's electroretinogramm is not influenced by impulses passing to the eye along the optic nerve. J. Physiol. Lond. 163, 565-558 (1962)
- Brooke, R.N.L., Downer, J. de C., Powell, T.P.S.: Centrifugal fibres to the retina in the monkey and cat. Nature 207, 1365-1367 (1965)
- Bunt, S.M., Lund, R.D.: Development of a transient retino-retinal pathway in hooded and albino rats. Brain Res. 211, 399-404 (1981)

- Bunt, S.M., Lund, R.D., Land, P.W.: Prenatal development of the optic projection in albino and hooded rats. Dev. Brain Res. 6, 149-168 (1983)
- Campbell, G., So, K.-F., Lieberman, A.R.: Normal postnatal development of retinogeniculate axons and terminals and identification of inappropriately-located transient synapses: Electron microscope studies of horseradish peroxidase-labelled retinal axons in the hamster. Neuroscience 13, 743-759 (1984)
- Clarke, S., Innocenti, G.M.: Projections transitoires de l'écorce auditive vers l'écorce visuelle chez le chaton nouveau-ne. Acta Anat. 121, 248 (1985)
- Cowan, W.M.: Selection and control in neurogenesis. In: The Neurosciences Fourth Study Programm. Schmitt, F.O., Worden, F.G. (eds.), MIT Press, Cambridge, MA, London, Kapitel 5, 59-79 (1979)
- Cowan, W.M., Adamson, L., Powell, T.P.S.: An experimental study of the avian visual system. J. Anat. 95, 545-563 (1961)
- Cowan, W.M., Gottlieb, D.I., Hendrickson, A.E., Price, J.L., Woolsey, T.A.: The autoradiographic demonstration of axonal connections in the central nervous system. Brain Res. 37, 21-51 (1972)

- Cowan, W.M., Fawcett, J.W., O'Leary, D.D.M., Stanfield, B.B.: Regressive events in neurogenesis. *Science* 225, 1258-1265 (1984)
- Cragg, B.G.: Centrifugal fibres to the retina and olfactory bulb, and composition of the supraoptic commissures in the rabbit. *Exp. Neurol.* 5, 406-427 (1962)
- Dacey, D.M.: Wide-spreading terminal axons in the inner plexiform layer of the cat's retina: Evidence for intrinsic axon collaterals of ganglion cells. *J. Comp. Neurol.* 242, 247-262 (1985)
- Dodt, E.: Centrifugal impulses in rabbit's retina. *J. Neurophysiol.* 19, 301-307 (1956)
- Dreher, B., Potts, R.A., Bennett, M.R.: Evidence that the early postnatal reduction in the number of rat retinal ganglion cells is due to a wave of ganglion cell death. *Neurosci. Lett.* 36, 255-260 (1983)
- Ebbesson, S.O.E.: The parcellation theory and its relation to interspecific variability in brain organization, evolutionary and ontogenetic development, and neuronal plasticity. *Cell Tissue Res.* 213, 179-212 (1980)
- Edwards, M.A., Schneider, G.E., Caviness, V.S.: Development of the crossed retinocollicular projection in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 248, 410-421 (1986)

Ehrlich, D., Mills, D.: The effects of binocular and monocular occlusion on the number of optic nerve axons containing degenerative organelles. *Neurosci. Lett.* 54, 351-356 (1985)

Giolli, R.A., Guthrie, M.D.: The primary optic projections in the rabbit. An experimental degeneration study. *J. Comp. Neurol.* 136, 99-126 (1969)

Glees, P.: Terminal degeneration within the central nervous system as studied by a new silver method. *J. Neuropathol.* 5, 54-59 (1946)

Godement, P., Salaün, J., Imbert, M.: Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 230, 552-575 (1984)

Goldberg, S.: Unidirectional, bidirectional and random growth of embryonic optic axons. *Exp. Eye Res.* 25, 399-404 (1977)

Goldberg, S., Frank, B.: The guidance of optic axons in the developing and adult mouse retina. *Anat. Rec.* 193, 763-774 (1979)

Granit, R.: Centrifugal and antidromic effects on ganglion cells of retina. *J. Neurophysiol.* 18, 388-411 (1955)

Guillery, R.W.: Neural abnormalities of albinos . TINS 9, 364-367 (1986)

Guillery, R.W., Scott, G.L., Cattanach, B.M., Deol, M.S.: Genetic mechanisms determining the central visual pathways of mice. Science 179, 1014-1016 (1973)

Hadley, R.T., Trachtenberg, M.C.: Poly-L-ornithine enhances the uptake of horseradish peroxidase. Brain Res. 158, 1-14 (1978)

Halfter, W.: Anterograde tracing of retinal axons in the avian embryo with low molecular weight derivatives of biotin. Dev. Biol. 119, 322-335 (1987)

Hanker, J.S., Yates, P.E., Metz, C.B., Rustioni, A.: A new specific sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. Histochem. J. 9, 789-792 (1977)

Heimer, L.: Bridging the gap between light and electron microscopy in the experimental tracing of fiber connections. In: Contemporary Research Methods in Neuroanatomy. Nauta, W.J.H., Ebesson, S.O.E. (eds.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1970)

- Hendrickson, A., Edwards, S.B.: The use of axonal transport for autoradiographic tracing of pathways in the central nervous system. In: Neuroanatomical Research Technique. Robertson, R.T. (ed.), Academic Press, New York pp. 241-290 (1978)
- Holden, L.A.: An investigation of the centrifugal pathway to the pigeon retina. J. Physiol. 186, 133P (1966)
- Holländer, H.: The section embedding (SE) technique. A new method for the combined light and electron microscopic examination of central nervous tissue. Brain Res. 20, 29-47 (1970)
- Honrubia, F.M., Elliott, J.H.: Efferent innervation of the retina. II. Morphologic study of the monkey retina. Invest. Ophthalmol. 9, 971-976 (1970)
- Hoogland, P.V., Vanderkrans, A., Koole, F.D., Groenewegen, H.J.: A direct projection from the nucleus oculomotorius to the retina in rats. Neurosci. Lett. 56, 323-328 (1985)
- Horsburgh, G.M., Sefton, A.J.: Cellular degeneration and Synaptogenesis in the developing retina of the rat. J. Comp. Neurol. 263, 553-566 (1987)

Innocenti, G.M.: Transitory structures as substrate for developmental plasticity of the brain. In: Recovery from Brain Damage. van Hof, M.W., Mohn, J. (eds.), Elsevier, Amsterdam pp. 305-333 (1982)

Innocenti, G.M., Koppel, H., Clarke, S.: Transitory macrophages in the white matter of the developing visual cortex. I. Light and electron microscopic characteristics and distribution. Dev. Brain Res. 11, 39-53 (1983a)

Innocenti, G.M., Clarke, S., Koppel, H.: Transitory macrophages in the white matter of the developing visual cortex. II. Development and relations with axonal pathways. Dev. Brain Res. 11, 55-66 (1983b)

Insausti, R., Blakemore, C., Cowan, W.M.: Ganglion cell death during development of ipsilateral retino - collicular projection in golden hamster. Nature 308, 362-365 (1984)

Itaya, S.K.: Retinal efferents from the pretectal area in the rat. Brain Res. 201, 436-441 (1980)

Itaya, S.K., Williams, T.H., Engel, E.I.: Anterograde transport of horseradish peroxidase enhanced by poly-L-ornithine. Brain Res. 150, 170-176 (1978)

- Jeffery, G., Arzymanow, B.J., Lieberman, A.R.: Does the early exuberant retinal projection to the superior colliculus in the neonatal rat develop synaptic connections? Dev. Brain Res. 14, 135-138 (1984)
- Jeffery, G., Perry, V.H.: Evidence for ganglion cell death during development of the ipsilateral retinal projection in the rat. Dev. Brain Res. 2, 176-180 (1982)
- Kato, T., Hirano, A., Honda, K., Katagiri, T., Sasaki, H.: Transient retino - inferior collicular fibres in neonatal rats: Their persistence after removal of one eye at birth. Neuropath. Appl. Neurobiol. 11, 265-272 (1985)
- Katz, L.C., Burkhalter, A., Dreyer, W.J.: Fluorescent latex microspheres as a retrograde neuronal marker for in vivo and in vitro studies of visual cortex. Nature 310, 498-500 (1984)
- Killackey, H.P.: Glia and the elimination of transient cortical projections. TINS 7, 225-226 (1984)
- Kliot, M., Shatz, C.J.: Abnormal development of the retinogeniculate projection in siamese cats. J. Neurosci. 5, 2641-2653 (1985)

- Lia, B., Williams, R.W., Chalupa, L.M.: Does axonal branching contribute to the overproduction of optic nerve fibers during early development of cat's visual system? Dev. Brain Res. 25, 296-301 (1986)
- Lin, H.: A consideration of the existence of centrifugal optic fibers in the cat. Anat. Rec. 175 (1973)
- Linden, R., Perry, V.H.: Massive retinotectal projection in rats. Brain Res. 272, 145-149 (1983)
- Ling, E.A.: Some aspects of amoeboid microglia in the corpus callosum and neighbouring regions of neonatal rats. J. Anat. 121, 29-45 (1976)
- Luciano, L., Spitznas, M., Reale, E.: Morphologic evidence of centrifugal fibers in the retina. Ophthalmologica 163, 281-287 (1971)
- Lund, R.D.: Uncrossed visual pathways of hooded and albino rats. Science 149, 1506-1507 (1965)
- Mesulam, M.-M.: Tetramethylbenzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: A non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. J. Histochem. Cytochem. 26, 106-117 (1978)

- Mooney, R.D., Klein, B.G., Szczepanik, A.M., Rhoades, R.W.:
Extensive recrossing of retinotectal axons after neonatal
unilateral superior collicular lesions in hamster. Dev.
Brain Res. 19, 297-313 (1985)
- Nachbin, L., Lent, R., Linden, R.: Transient macrophages in
the white matter of developing hamsters. II. Relation to
axonal degeneration. Braz. J. Med. Biol. Res. 17, 404
(1984)
- Nauta, W.J.H.: Silver impregnation of degenerating axons.
In: New Research Techniques of Neuroanatomy. Windle, W.F
(ed.), Charles C. Thomas Publisher, Springfield, pp.
17-26 (1957)
- O'Leary, D.D.M.: Remodelling of early axonal projections
through the selective elimination of neurons and long
axon collaterals. In: Ciba Foundation Symposia 126,
113-142 (1987)
- O'Leary, D.D.M., Gerfen, Ch.R., Cowan, W.M.: The
development and restriction of the ipsilateral
retinofugal projections in the chick. Dev. Brain Res. 10,
93-109 (1983)
- O'Leary, D.D.M., Stanfield, B.B.: A transient pyramidal
tract projection from the visual cortex in the hamster
and its removal by selective collateral elimination. Dev.
Brain Res. 27, 87-99 (1986)

O'Leary, D.D.M., Stanfield, B.B., Cowan, W.M.: Evidence that the early postnatal restriction of the cells of origin of the callosal projection is due to the elimination of axonal collaterals rather than to the death of neurons. Dev. Brain Res. 1, 607-617 (1981)

O'Leary, D.D.M., Thanos, S.: A transient retinofugal pathway in the chick embryo and its possible role in the guidance of axons to the retina. Anat. Rec. 211, 142A (1985)

Oppenheim, R.W.: Naturally occurring cell death during neuronal development. TINS 8, 487-493 (1985)

Panneton, W.M.: The persistence of a normally transient cerebrocerebellar pathway in the cat. Dev. Brain. Res. 30, 133-139 (1986)

Panneton, W.M., Tolbert, D.L.: The collateral origin of a transient cerebrocerebellar pathway in kittens. A study using fluorescent double - labelling techniques. Dev. Brain Res. 14, 247-254 (1984)

Panneton, W.M., Tolbert, D.L.: Persistence of a normally transient cerebrocerebellar pathway in the cat. Anat. Rec. 211, 146A (1985)

Perry, V.H., Cowey, A.: The effects of unilateral cortical and tectal lesions on retinal ganglion cells in rats. Exp. Brain Res. 35, 85-95 (1979)

Perry, V.H., Cowey, A.: A sensitive period for ganglion cell degeneration and the formation of aberrant retino-fugal connections following tectal lesions in rats. Neuroscience 7, 583-594 (1982)

Perry, V.H., Henderson, Z., Linden, R.: Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. J. Comp. Neurol. 219, 356-368 (1983)

Provis, J.M.: The distribution and size of ganglion cells in the retina of the pigmented rabbit: A qualitative analysis. J. Comp. Neurol. 185, 121-138 (1979)

Rager, G.: Systems-matching by degeneration II. Exp. Brain Res. 33, 79-90 (1978)

Rager, G., Rager, U.: Systems-matching by degeneration I. Exp. Brain Res. 33, 65-78 (1978)

Rager, G., Lausmann, S., Gallyas, F.: An improved silver stain for developing nervous tissue. Stain Technol. 54, 193-200 (1979)

Reese, B.E.: The topography of expanded uncrossed retinal projections following neonatal enucleation of one eye: Differing effects in dorsal lateral geniculate nucleus and superior colliculus. J. Comp. Neurol. 250, 8-32 (1986)

Robertson, B., Grant, G.: A comparison between wheat germ agglutinin and choleragenoid-horseradish peroxidase as anterogradely transported markers in central branches of primary sensory neurones in the rat with some observations in the cat. Neuroscience 14, 895-905 (1985)

Schmued, L.C., Fallon, J.H.: Fluoro-Gold: A new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. Brain Res. 377, 147-154 (1986)

Schneider, G.E.: Two visual systems. Brain mechanisms for localization and discrimination are dissociated by tectal and cortical lesions. Science 163, 895-902 (1969)

Schnyder, H., Künzle, H.: Is there a retinopetal system in the rat? Exp. Brain Res. 56, 502-508 (1984)

Schober, W.: Die Herkunft der zentrifugalen Fasern im Tractus opticus der Ratte. Anat. Anz. 136, 136-147 (1974)

Schubert, P., Holländer, H.: Methods for the delivery of tracers to the central nervous system. In: The Use of Axonal Transport for Studies of Neuronal Connectivity. Cowan, W.M., Cuenod, M. (eds.), Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, pp. 114-125. (1975)

Shatz, C.J., Klot, M.: Prenatal misrouting of the retinogeniculate pathway in siamese cats. *Nature* 300, 525-529 (1982)

Silver, J., Sapiro, J.: Axonal guidance during development of the optic nerve: The role of pigmented epithelia and other extrinsic factors. *J. Comp. Neurol.* 202, 521-538 (1981)

So, K.-F., Schneider, G.E.: Abnormal recrossing retinotectal projections after early lesions in syrian hamsters: Age-related effects. *Brain Res.* 147, 277-295 (1978)

Stanfield, B.B.: Postnatal reorganization of cortical projections: the role of collateral elimination. *TINS* 7, 37-41 (1984)

Stanfield, B.B., O'Leary, D.D.M.: Maintained targets of occipital cortical neurons which transiently extend a pyramidal tract axon during development. *Neurosci. Abstr.* 9, 375 (1983)

Stanfield, B.B., O'Leary, D.D.M.: The transient corticospinal projection from the occipital cortex during the postnatal development of the rat. J. Comp. Neurol. 238, 236-248 (1985)

Stanfield, B.B., O'Leary, D.M., Fricks, C.: Selective collateral elimination in early postnatal development restricts cortical distribution of rat pyramidal tract neurones. Nature 298, 371-373 (1982)

Stone, J.: The whole mount handbook. A guide to the preparation and analysis of retinal wholemounts. Maitland Publications Pty. Ltd., Sydney (1981)

Terubayashi, H., Fujisawa, H., Itoi, M., Ibata, Y.: Hypothalamo-retinal centrifugal projection in the dog. Neurosci. Lett. 40, 1-6 (1983)

Thanos, S., Bonhoeffer, F.: Development of the transient ipsilateral retinotectal projection in the chick embryo: A numerical fluorescence - microscopic analysis. J. Comp. Neurol. 224, 407-414 (1984)

Thanos, S., Bonhoeffer, F., Rutishauser, U.: Fiber-fiber interaction and tectal cues influence the development of the chicken retinotectal projection. Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 81, 1906-1910 (1984)

Thanos, S., Vidal-Sanz, M., Aguayo, A.J.: The use of rhodamine-B-isothiocyanate (RITC) as an anterograde and retrograde tracer in the adult rat visual system. Brain Res. 406, 317-321 (1987)

Tolbert, D.L., Panneton, W.M.: The transience of cerebrocerebellar projections is due to selective elimination of axon collaterals and not to neuronal death. Dev. Brain Res. 16, 301-306 (1984)

Trojanowski, J.Q., Gonatas, J.O., Gonatas, N.K.: Conjugates of horseradish peroxidase (HRP) with cholera toxin and wheat germ agglutinin are superior to free HRP as orthogradely transported markers. Brain Res. 223, 381-385 (1981)

Vaney, D.I., Hughes, A.: The rabbit optic nerve: Fibre diameter spectrum, fibre count, and comparison with a retinal ganglion cell count. J. Comp. Neurol. 170, 241-252 (1976)

Vaney, D.I., Peichl, L., Wässle, H., Illing, R.-B.: Almost all ganglion cells in the rabbit retina project to the superior colliculus. Brain Res. 212, 447-453 (1981)

van Hasselt, P.: The centrifugal control of retinal function. Ophthal. Res. 4, 298-320 (1972)

Weidner, C., Micelli, D., Reperant, J.: Orthograde axonal and transcellular transport of different fluorescent tracers in the primary visual system of the rat. Brain Res. 272, 129-136 (1983)

West, J.R., Black, A.C.: Enhancing the anterograde movement of HRP to label sparse neuronal projections. Neurosci. Lett. 12, 35-40 (1979)

Wikler, K.C., Kirn, J., Windrem, M.S., Finlay, B.L.: Control of cell number in the developing visual system. II. Effects of partial tectal ablation. Dev. Brain Res. 28, 11-21 (1986)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Holländer danke ich recht herzlich für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit, Herrn Prof. Dr. U. Smola für die Betreuung im Rahmen der Fakultät für Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Für Technische Hilfe bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie in Martinsried, insbesondere bei Frau R. Müller, Frau R. Scheil, Frau B. Schwarz und Herrn L. Holzapfel.

Für wertvolle Diskussionen danke ich Herrn R. Egensperger und Herrn Dr. med. W. Gudden.

Lebenslauf

- 1958 Geboren am 5. 11. in Landau in der Pfalz
- 1964-1968 Besuch der Volksschule in Ottersheim bei Landau
- 1968-1977 Max- Slevogt- Gymnasium in Landau
- 1977 Abitur
- 1977-1978 Wehrdienst
- 1978-1984 Studium der Biologie an der Eberhard-
 Karls- Universität in Tübingen
- 1984 Diplom in Biologie mit dem Hauptfach
 Zoophysiologie und den Nebenfächern Genetik,
 Pharmakologie und Biochemie.
 Diplomarbeit: Struktur und Anordnung der
 Sehzellen bei den Osteoglossomorpha,
 insbesondere bei den Mormyridae.
 Betreuer: Prof. Dr. W. Harder
- 1985-1987 Doktorarbeit am Max- Planck- Institut für
 Psychiatrie in der Abteilung Neuromorphologie
 unter Anleitung von Prof. Dr. H. Holländer.

